

DER EINFLUSS VON
BLUTGLUKOSESCHWANKUNGEN AUF DIE
KONZENTRATION DES 2,3-DIPHOSPHOGLYZERATS
IN DEN ERYTHROZYTEN VON NORMALEN,
DIABETISCHEN UND
HYPOGLYKÄMISCHEN PERSONEN

Albert Standl

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546706_0030

Aus der Forschergruppe Diabetes und der III. Medizinischen
Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing
Chefarzt: Professor Dr. H. Mehnert

DER EINFLUSS VON BLUTGLUKOSESCHWANKUNGEN AUF
DIE KONZENTRATION DES 2, 3-DIPHOSPHOGLYZERATS
IN DEN ERYTHROZYTEN VON NORMALEN, DIABETI-
SCHEN UND HYPOGLYKÄMISCHEN PERSONEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Albert Standl
aus München

1974

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.1.1975



Meinen Eltern

	Seite
<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	
EINLEITUNG	1
METHODEN	2
In-vitro-Versuche	2
Glukosebestimmung	4
Hämoglobin-Bestimmung	5
Laktat-Bestimmung	6
Bestimmung des 2, 3-Diphosphoglyzerats	7
Adenosintriphosphat-Bestimmung	9
Versuche mit Insulin und Tolbutamid	11
Insulinbestimmung	12
In-vivo-Versuche	13
RESULTATE	14
In-vivo-Versuche	14
In-vitro-Versuche	20
Versuche mit Insulin und Tolbutamid	26
DISKUSSION DER LITERATUR	32
Die Rolle des 2, 3-Diphosphoglyzerats im Stoffwechsel	32
Die Bindung des 2, 3-DPG an das Hämoglobin	33
Änderung der Konzentration des 2, 3-DPG bei verschiedenen Krankheiten	35
2, 3-Diphosphoglyzerat-Spiegel und Wasserstoff-ionenkonzentration im Erythrozyten	36
Verhalten des 2, 3-DPG in Blutkonserven	38
Wechselwirkungen zwischen 2, 3-DPG-Konzentration und Glykolyse	38
Der Erythrozyten-Stoffwechsel	39
Die Regulation der Glykolyse	41
Die Bedeutung der Verformbarkeit des Erythrozyten	44
Veränderung im Enzymmuster der Blutzellen bei Diabetes mellitus	45

	Seite
Mögliche rheologische Veränderungen der Blutzellen bei Diabetes mellitus	45
Entstehung der diabetischen Angiopathie	46
DISKUSSION DER EIGENEN ERGEBNISSE	49
ZUSAMMENFASSUNG	53
LITERATURVERZEICHNIS	54
LEBENS LAUF	

EINLEITUNG

Schon seit langem wurde vermutet, daß eine über einen längeren Zeitraum bestehende Hypoxie des Gewebes bei der Entwicklung der diabetischen Mikroangiopathie eine Rolle spielen könnte (4, 5). Ditzel (23) entwickelte die Theorie der "funktionellen Mikroangiopathie", der ersten faßbaren Veränderung der diabetischen Gefäßkrankheit. Nach diesem Konzept sind Verschiebungen in der Sauerstoff- und Kohlendioxid-Spannung des Gewebes entscheidend wichtig für die Entstehung dieser Krankheit. Benesch und Chanutin (9, 20) haben die Bedeutung des 2,3-Diphosphoglyzerats (2,3-DPG) auf die Affinität der Sauerstoff-Bindung zum Hämoglobin in den Erythrozyten aufgezeigt. Sie fanden, daß das 2,3-DPG die Sauerstoff-Abgabe aus den roten Blutzellen erleichtert. Vor allem die Erforschung der Regulationsmechanismen, nach denen das 2,3-DPG in den Erythrozyten auf- und abgebaut wird, hat großes Interesse gefunden. Es wurden verschiedene klinische Zustände, wie Anämie, Azidose, Leberzirrhose und Herzkrankheit entdeckt, bei denen Veränderungen im 2,3-DPG-Spiegel des Erythrozyten vorkommen. Vor kurzem wies E. Standl einen 2,3-DPG-Abfall bei Diabetikern nach, der in Verbindung mit der Senkung des Blut-Glukose-Spiegels auftritt (60).

Zweck dieser Arbeit war es, in in-vivo und in-vitro Versuchen den Einfluß der Blutglukose auf den 2,3-DPG-Spiegel bei Normalen, Diabetikern und zwei Patienten mit Inselzelltumoren zu erforschen, sowie in-vitro zu überprüfen, ob Insulin und Tolbutamid dabei eine Rolle spielen.

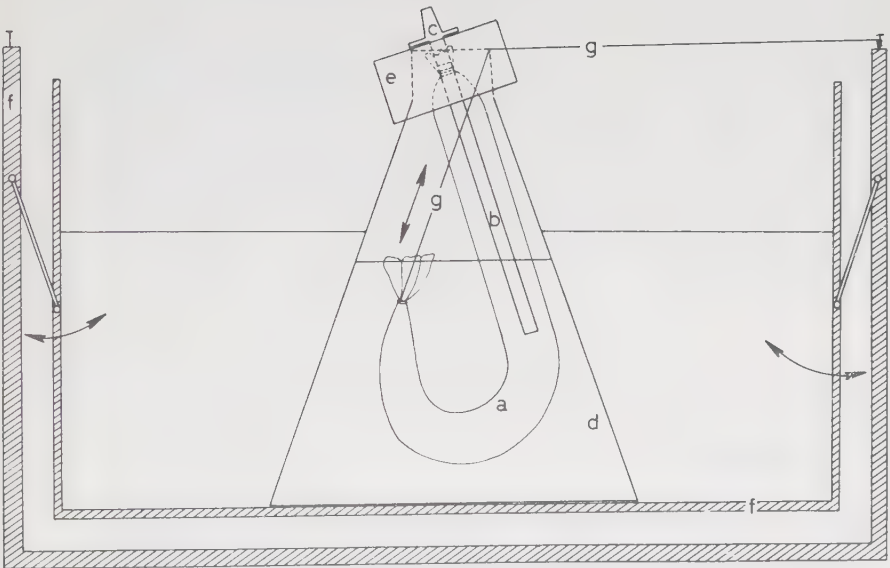
METHODEN

In-vitro-Versuche

Für die in-vitro-Versuche wurde den Patienten morgens nach dem Frühstück venöses Blut abgenommen, wobei als Antikoagulans Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet wurde. 10 ml einer jeden Blutprobe wurden in einen Dialysierschlauch gefüllt, der vorher in Wasser aufgeweicht und mit einem starken Bindfaden um ein Plastikröhrchen gebunden worden war (Zeichnung 1). Dieses Röhrchen diente als Ansatzstück für Blutabnahmen während der Dialyse. Der Dialysierschlauch wurde in einen mit Inkubationspuffer gefüllten Erlenmeyer-Kolben gehängt und an einer Plastikkappe befestigt. Diese Anordnung ermöglichte, daß der Dialysierschlauch frei beweglich in die Pufferlösung eintauchte. Der Inkubationspuffer enthielt pro Liter destilliertes Wasser 8,040 g NaCl, 0,370 g KCl und 0,350 g NaHCO₃, außerdem Glukose in einer Konzentration von 80 mg/100 ml oder 400 mg/100 ml. Durch Begasen mit Carbogen wurde der pH-Wert des Puffers auf 7,4 eingestellt. Der Kolben wurde in einem Schüttelbad befestigt, das auf 37° C erwärmt war. Das untere Ende des Dialysierschlauches war mittels einer Schnur mit der festen Einfassung des Schüttelbades verbunden. Auf diese Weise wurde neben der horizontalen Schüttelbewegung auch eine vertikale Auf- und Abwärtsbewegung des Dialysierschlauches erreicht, wodurch das Blut im Dialysierschlauch gut durchmischt wurde und sein Sauerstoffdruck während des gesamten Versuches über 100 Torr lag.

Diese Versuchsanordnung gewährleistete, daß sich die gewünschte Glukosekonzentration der Blutprobe im Dialysierschlauch rasch einstellte und von der Glukosekonzentration im Dialysat auf diesem Spiegel konstant gehalten wurde. Innerhalb von 15 Minuten sank die Blutglukosekonzentration von deutlich hyperglykämischen Diabetikern (über 300 mg/100 ml) auf etwa 80 mg/100 ml, wenn das Blut gegen diese Glukosekonzentration dialysiert wurde. So wurde eine Besserung des Diabetes in-vitro nachgeahmt. Für Experimente bei hoher Glukosekonzentration (400 mg/100 ml) wurde das Blut gegen 400 mg/100 ml

Zeichnung 1



Erklärung zu Zeichnung 1

- a = Dialysierschlauch
- b = Plastikröhrchen
- c = Ansatzstück für Blutabnahmen
- d = Erlenmeyer-Kolben
- e = Plastikkappe
- f = Schüttelbad
- g = Schnur

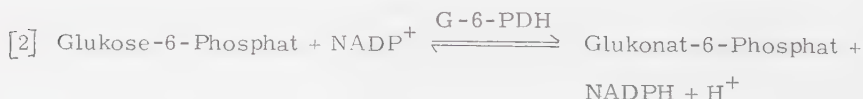
Glukose dialysiert, nachdem ein Aliquot an konzentrierter Glukose-Lösung dem Blut zugefügt worden war. Der Sauerstoffdruck betrug während der Dialyse konstant über 100 Torr, was mit der geeichten Sauerstoff-Elektrode (A 3 Potentiograph Eschweiler, Kiel) gemessen wurde. Der pH-Wert des Blutes blieb unverändert bei 7,4. Die Gesamt-Laktatkonzentration im Dialysat nahm als Ausdruck der normalen Stoffwechselaktivität der Erythrozyten über den Zeitraum von 7 Stunden beständig zu, während sie im dialysierten Blut im wesentlichen unverändert bei 1 mM blieb. Zu Beginn des Inkubationsversuches, nach 2 Stunden, nach 5 Stunden und nach 7 Stunden wurden mit einer Spritze durch das Plastikröhrchen aus dem Dialysierschlauch jeweils etwa 1 ml Blut und aus dem Kolben ein Aliquot der Pufferlösung entnommen. Im Blut wurden jeweils die Konzentrationen von Glukose, Hämoglobin, 2,3-DPG und ATP, im Puffer die Glukosekonzentration bestimmt.

Glukosebestimmung

Die Glukosekonzentrationsbestimmungen des Bluts und der Pufferlösung wurden nach der Methode mit Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (32, 33) durchgeführt. Bei dieser optischen Methode katalysiert die Hexokinase die Phosphorylierung von Glukose durch ATP [1]



Glukose-6-Phosphat wird in Gegenwart von NADP^+ durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxydiert [2] .



Die NADPH-Zunahme, gemessen an der Extinktionsänderung bei 340 (334, 365) nm, ist der Glukose-Menge proportional.

Die Blutproben werden mit Hilfe von 1,00 ml Perchlorsäure enteiweißt.

Die Messung im Photometer erfolgt bei einer Meßstrahlung von 340 nm, die Schichtdicke der Küvette beträgt 1 cm und das Testvolumen 2,94 ml. An Reagentien werden benötigt:

Triäthanolamin-Hydrochlorid

Magnesiumsulfat, p.a., $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Adenosin-5'-Triphosphat, ATP

Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, NADP

Hexokinase, HK

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, G6P-DH

Die Berechnung der Glukosekonzentration erfolgt nach der Formel [3]
(siehe ATP-Bestimmung)

$$[3] \quad c = \frac{\Delta E \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v} [\mu \text{ Mol/ml}]$$

- c = Konzentration [$\mu \text{ Mol/ml}$]
 ΔE = Extinktionsänderung
 V = Testvolumen [ml]
 ϵ = Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2 / \mu \text{ Mol}$]
 d = Schichtdicke [cm]
 v = Probevolumen im Text [ml]

Hämoglobin-Bestimmung

Die Hämoglobin-Bestimmungen wurden nach der Zyanhämoglobinmethode (28) ausgeführt. Diese Methode beruht auf der Fähigkeit des Hä-

moglobins, stabile Verbindungen mit chemischen Substanzen einzugehen, wobei eine charakteristische Farbänderung auftritt. Durch Zusatz von Kaliumferrizyanid zur Blutprobe wird das Blut hämolysiert und das freiwerdende Hämoglobin in Zyanhämoglobin umgewandelt; der entstehende Farbstoff ist sehr stabil. Als Zyanid-Reagens verwendeten wir die Drabkinsche Lösung, die sich wie folgt zusammensetzt:

Kaliumferrizyanid p.a.	0,2 g
Kaliumzyanid p.a.	0,05 g
Natriumbikarbonat p.a.	1,0 g
Kaliumkarbonat	0,1 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

Man pipettiert zu einem Reagenzglasröhrchen mit 5,0 ml Zyanid-Reagens jeweils 0,02 ml aus der Blutprobe, schüttelt vorsichtig, beläßt alle Röhrchen etwa 30 Minuten bei Zimmertemperatur und photometriert anschließend in einer Küvette mit 10 mm Lichtweg bei 540 nm gegen die entsprechende Zyanid-Lösung. Aus den abgelesenen Extinktionswerten ermittelt man anhand einer Tabelle die aktuelle Hämoglobinmenge pro 100 ml Blut.

Laktat-Bestimmung

Die Methode (31) basiert auf der Reaktion von L-Laktat mit NAD unter Laktat-Dehydrogenase-Katalyse nach der folgenden Reaktionsgleichung [4] :



Die NADH-Bildung, gemessen an der Extinktionszunahme im Photometer bei 340 (334, 366) nm ist die Meßgröße. L-Laktat wird quantitativ umgesetzt. Die Laktat-Konzentration der Probe läßt sich nach der Gleichung [5] berechnen:

$$c = \frac{\Delta E \cdot V}{\xi \cdot d \cdot v} \quad [\mu \text{ Mol/ml}] \quad (\text{in der Probe}) \quad [5]$$

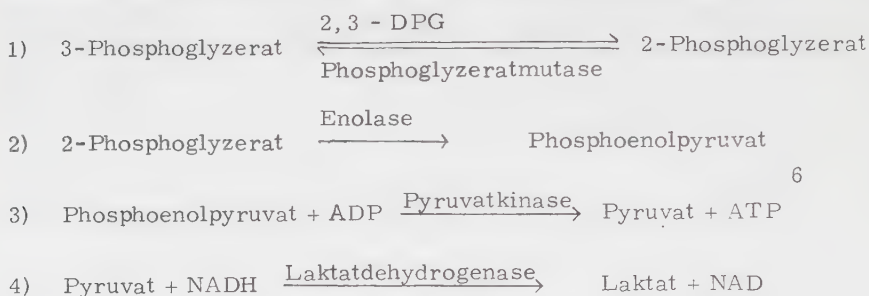
- c = Konzentration (μ Mol/ml)
 ΔE = Extinktionsänderung
V = Testvolumen (ml)
 ξ = Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$)
d = Schichtdicke (cm)
v = Probevolumen im Test (ml)

Bestimmung des 2, 3-Diphosphoglyzerats

Für die 2, 3-DPG- und ATP-Bestimmung wurden jeweils 0,5 ml Vollblut in ein Reagenzglas mit 2 ml 5 %iger Trichloressigsäure pipettiert (1 Volumenteil Blut in 4 Volumenteilen Trichloressigsäure). Eine Magnetskugel wurde in das Reagenzglas zugegeben und die Probe ferner mit einem automatischen Schüttler und anschließend 5 Minuten mit einem Magnetprüher durchmischt. Der klare Überstand nach 5minütiger Zentrifugation mit 4000 g bei Raumtemperatur wurde in 1 ml Plastikröhrchen abgegossen und bei -20°C tiefgefroren (Extraktion 1). Der zurückbleibende braune Niederschlag wurde nochmals mit 2 ml 5 %iger Trichloressigsäure nachextrahiert. Ein zweiter Überstand wurde nach den gleichen Arbeitsgängen wie zuvor gewonnen (Extraktion 2). Es hatte sich nämlich in Vorversuchen gezeigt, daß die erste Extraktion allein nur etwa 70 % der in den Erythrozyten enthaltenen Gesamtmenge an 2, 3-DPG lieferte, wohingegen die erste und zweite Extraktion zusammen mehr als 95 % ergaben.

Für die 2, 3-DPG-Bestimmung wurden die Proben aufgetaut und von Extraktion 1 und Extraktion 2 jeweils 0,1 ml in ein Reagenzglas pipettiert. Es wurden 0,2 ml 2 molaren Tris-Puffers mit pH 7,4 zur

Neutralisation der Proben und anschließend 1,6 ml destilliertes Wasser zugegeben. Das 2,3-DPG wurde nun nach der Methode von Nygaard (43) bestimmt. Das Prinzip dieser enzymatischen Methode gründet sich auf den katalytischen Effekt des 2,3-DPG auf die Geschwindigkeit der Phosphoglyzerat-Mutase-Reaktion. Zur Identifizierung wird diese Reaktion mit weiteren enzymatischen Reaktionen gekoppelt, wie in den folgenden Gleichungen [6] dargestellt, wobei Enolase, Pyruvatkinase und Laktat-Dehydrogenase als Hilfsenzyme fungieren.

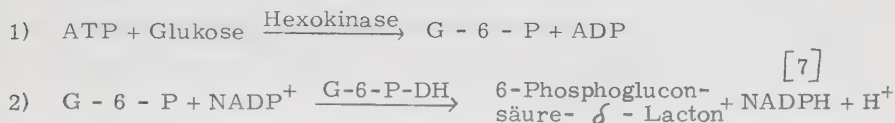


6

Bei dieser letztgenannten Reaktion nimmt das NADH ab, was man im Photometer bei 334 nm Absorption verfolgen kann. Es wurde ein Eppendorff-Photometer mit Halbmikroküvetten 1,0 ml und Schichtdicke 1,0 cm und die fertige Enzym-Substrat-Packung von Calbiochem (Katalog Nummer 86 92 37) benützt. 0,95 ml der fertigen Lösung wurden in die Küvette pipettiert, 2 Minuten im Küvettenhalter auf eine Temperatur von 25°C gebracht und dann 50 λ der, wie vorhin beschrieben, bereiteten Probe zugegeben. Die Messung wurde vom Kompensationsschreiber des Eppendorff-Photometers im normalen Empfindlichkeitsbereich aufgezeichnet und die Extinktionsdifferenz nach 4 Minuten abgelesen. Zur Eichung wurden definierte 2,3-DPG-Mengen, nämlich 1,25 μmol und 0,50 μmol in den Test eingesetzt und aus den gewonnenen Extinktionen eine Eichkurve angefertigt. In dieser wurde die 2,3-DPG-Menge gegen die Extinktionsänderung aufgetragen und die für die Proben erhaltenen Werte eingesetzt. Die abgelesenen Werte der 2,3-DPG-Mengen wurden auf Gramm Hämoglobin bezogen. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode lag bei 4 %.

Adenosintriphosphat-Bestimmung

Für die ATP-Bestimmung wurde die enzymatische Methode von Lamprecht und Trautschold (36) entsprechend der folgenden Reaktionsgleichung [7] angewandt.



Pro Mol ATP entsteht also ein Mol NADPH, das bei 334 nm Extinktion im Photometer gemessen werden kann. Die, wie vorher beschrieben, erhaltenen 1. und 2. Extraktionen wurden aufgetaut, von Extraktion 1 und 2 jeweils 0,5 ml zusammen in ein Reagenzglas pipettiert und die Trichloressigsäure zweimal mit 4fachen Volumenteilen Diäthyläther ausgeschüttelt. Der pH-Wert stieg dabei von etwa 1 auf 3 bis 4, die vollständige Neutralisation erfolgte dann in der Küvette. An Reagenzien wurden benutzt

- 1) Triäthanolamin-hydrochlorid (TRAM) von pH 7,6 0,05 M.
4,65 g TRAM wurden in 200 ml Wasser gelöst, dann 11 ml 1 normale Natronlauge zugegeben und auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt.
- 2) NADP 0,007 molar: 7,5 mg NADP wurden abgewogen und mit 1,5 ml H₂O gelöst.
- 3) Magnesiumchlorid 0,1 molar: 2,03 g MgCl₂ · 6 H₂O wurden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.
- 4) Glukose 0,5 molar: 0,99 g Glukose (C₆H₁₂O₆ · H₂O) wurden mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1 : 10 verdünnt, wodurch eine 0,05 molare Lösung entstand.
- 5) Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde mit Aqua dest. auf

auf 1 mg Protein pro ml verdünnt.

- 6) Hexokinase wurde mit Aqua dest. auf 2 mg Protein pro ml verdünnt.

Die Messungen wurden mit dem Eppendorff-Photometer durchgeführt und vom Kompensationsschreiber (4fache Empfindlichkeit) aufgezeichnet. Es wurden Halbmikro-Küvetten verwendet mit 1,0 ml Fassungsvermögen und 1,0 Schichtdicke. Gemessen wurde bei 334 nm und 25° C. In die Küvette wurden nun 0,7 ml TRAM, 0,1 ml $MgCl_2$, 50 λ NADP und 200 λ unserer Probe pipettiert, die Konstanz über etwa 1 Minute kontrolliert, 5 λ Glukose-6-phosphat Dehydrogenase zugegeben, eine erneute Konstanzkontrolle vorgenommen, 20 λ Glukose hinzupipettiert, nun sofort die Extinktion abgelesen und schließlich 10 λ Hexokinase hinzugegeben. Zwischen Glukose- und Hexokinase-Zugabe sollten nicht mehr als 30 Sekunden Zeitdifferenz liegen. Trotz einer Fremdaktivität von weniger als 0,1 % an Hexokinase in den Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Präparaten löst der Glukosezusatz einen, wenn auch kleinen, ATP-Umsatz aus (ΔE ca. 0,002 pro min.) (36). Die Extinktionsänderung ist nach 3 - 5 Minuten abgeschlossen. Die Intaktheit der Hilfsenzyme wurde anhand von ATP-Standardlösungen überprüft. Die erhaltenen Werte für die Extinktionsänderungen wurden nun in folgende Gleichung eingesetzt [8].

$$c = \frac{\Delta E \times V_{\text{küv.}} \times F}{\epsilon \times 1 \times V_{\text{pip.}} \times 4}$$

$$c = \frac{\Delta E \times 1,085 \times 10}{6,22 \times 0,2 \times 4}$$

$$c = \Delta E \times \frac{10,85}{4,976}$$

$$c = \Delta E \times 2,18$$

c = $\mu\text{mol ATP}$
 ΔE = Extinktionsänderung im Photometer
 $V_{\text{küv.}}$ = Volumen in der Küvette
 F = Verdünnung des Blutes [8]
 ϵ = Faktor für TPN bei 334 nm
 V_{pipette} = pipettiertes Volumen
 4 = Spreizung des Kompensationsschreibers

Die erhaltenen ATP-Werte wurden auf Gramm Hb bezogen.

Versuche mit Insulin und Tolbutamid

Für die Untersuchungen in Gegenwart von Insulin erwies sich das Dialysiersystem als nachteilig. Tests mit Jod¹²⁵-Insulin (16) zeigten, daß nach 30 Minuten etwa 80 % der zugegebenen Jodisotopen im Dialysat waren. Dieselben Ergebnisse wurden nach Durchführung einer radioimmunologischen Bestimmung des Insulins erhalten (30). Die Experimente mit Insulin und Tolbutamid wurden daher nach einem anderen Versuchsmodell durchgeführt:

Je 2,5 ml Blut wurden in Plastikzentrifugengläsern mit je 10,0 ml isotonem 0,02 molaren Trispuffer vermischt, der Natriumchlorid und Kaliumchlorid enthielt und einen pH-Wert von 7,4 besaß. Die Zentrifugengläser wurden in ein auf 37° C erwärmtes Wasserbad gestellt, wo das Blut unter Schütteln inkubiert wurde. Hinzugegeben wurde Glukose, so daß im Blut-Puffergemisch eine Glukosekonzentration von 80 oder 400 mg % erhalten wurde. Bei diesem System trat im Verlauf von 6 Stunden keine Hämolyse ein und mit Hilfe von J¹²⁵-Insulin sowie radioimmunologischen Insulinmessungen konnte gezeigt werden, daß nach 6stündiger Inkubationsdauer die Insulinkonzentration immer noch bei über 50 % des Ausgangswertes lag. pH-Wert und pO₂ blieben während des Versuchs konstant und die Laktat-Konzentration stieg kontinuierlich von 0,2 auf 1,0 mM an. Auch bei diesen Versuchen wurden nach den vorher beschriebenen Methoden zu Beginn der Inkubation, 15', 2 Std. 15', 4 Std. 15' und 6 Std. 15' nach Insulinzugabe Glukosekonzentration, Hb-Gehalt, 2,3-DPG-Konzentration und ATP-Konzentration ermittelt. Insulin wurde hinzugegeben in einer Endkonzentration von 500 μ E/ml.

Für die Versuche in Gegenwart von Tolbutamid wurde dasselbe Versuchsmodell benutzt. Die getestete Tolbutamidkonzentration betrug 0,1 mg pro ml Inkubationsvolumen.

Insulinbestimmung

Die Methode der radioimmunologischen Bestimmung von Insulin (30) beruht auf der Bildung von zwei Antigen-Antikörper-Komplexen, welche bei der Reaktion von radioaktiv markiertem Insulin (Antigen) und nicht markiertem Insulin (Antigen) mit dem Insulin-Antiserum (Insulin-Antikörper) entstehen. Unterschiedliche Mengen Insulin (nicht markiert) und eine konstante Menge Insulin (markiert) reagieren mit einer konstanten Menge Insulin-Antiserum, wobei sich lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe bilden. Die Trennung des antikörpergebundenen Insulins vom nicht gebundenen Insulin erfolgt durch Zugabe einer Aktivkohle-Dextran-Suspension, die das freie Insulin adsorbiert. Nach erfolgter Zentrifugation enthält die klare Lösung, je nach Insulin-Konzentration der Standardlösung und der Meßprobe, verschiedene Anteile Antigen-Antikörper-Komplex (markiert) und Antigen-Antikörper-Komplex (nicht markiert). Zwischen der komplexgebundenen Radioaktivität und der Insulin-Konzentration in der Standardlösung oder Meßprobe besteht eine enge Beziehung. Die Standardkurve erhält man durch Auftragen der komplexgebundenen Radioaktivität gegen die Insulin-Standardkonzentration. Die Insulin-Konzentrationen in den Meßproben können mit Hilfe der Standardkurve aufgrund der gemessenen Radioaktivität bestimmt werden.

In-vivo-Versuche

Es wurden 34 Diabetiker während ihres Krankenhausaufenthaltes und 14 Normalpersonen (Gruppe I) untersucht. Ein Diabetes wurde bei allen Normalen durch den Glukose-Toleranz-Test ausgeschlossen. Keiner der diabetischen Patienten war azidotisch oder litt an einer Anämie. Patienten mit Herz-, Lungenkrankheiten oder Niereninsuffizienz waren ausgeschlossen. Das Alter reichte von 22 bis 64 Jahre bei den Diabetikern und von 25 bis 60 Jahre bei den Normalpersonen. 21 Diabetiker hatten einen Insulin-abhängigen Diabetes und 13 wurden oral behandelt. Eine Gruppe von 10 Diabetikern war beträchtlich hyperglykämisch entgleist (Blutglukose zwischen 300 und 350 mg/100 ml), jedoch nichtazidotisch über den Zeitraum von mehr als einer Woche (Gruppe II). Diese Patienten wurden nachuntersucht, unmittelbar nachdem ihre Blutglukosewerte wieder normal waren (Gruppe III). Als weitere Gruppe wurden Patienten untersucht, deren Diabetes länger als eine Woche gut eingestellt gewesen war (Gruppe IV). Eine fünfte Gruppe bestand aus 11 metabolisch gut eingestellten Diabetikern mit Mikroangiopathie (Retinopathie), die durch Ophthalmoskopie gesichert war.

Den Patienten, die unter ihrer üblichen antidiabetischen Behandlung standen, wurde am Morgen nach dem Frühstück venöses Blut anaerob in heparinisierten Spritzen abgenommen.

Darüber hinaus wurden zwei Patienten mit Verdacht auf einen Inselzelltumor untersucht. Während die Patienten über Nacht fasteten, wurde ihnen in kurzen Zeitabständen Blut abgenommen bis zum Auftreten einer Hypoglykämie, die sofort durch die Gabe von Kohlenhydraten beendet wurde. In beiden Fällen wurde die Diagnose Inselzelltumor später histologisch bestätigt.

Von jeder Blutprobe wurde in einem Aliquot sofort in einem Blutgasanalysator (Corning-BEL Model 165) pH, Standard-Bikarbonat und $p\text{CO}_2$ gemessen.

Für die 2,3-DPG- und ATP-Bestimmung wurde dasselbe Verfahren wie bei den bereits beschriebenen in-vitro-Versuchen benützt.

RESULTATE

In-vivo-Versuche

Untersuchungen mit Blut von normalen Test-Personen (Gruppe I, Tabelle I) zeigten einen mittleren 2,3-DPG-Spiegel von $16,82 \pm 0,66 \mu\text{mol}$ pro Gramm Hämoglobin, was mit den Werten anderer Autoren gut übereinstimmt (Paniker et al. 45, Beutler et al. 12, Bellingham et al. 8). Der 2,3-DPG-Gehalt der Erythrozyten stellte sich bei Normalpersonen als über Monate konstante Größe heraus, wir konnten keine 2,3-DPG Änderung vor oder nach dem Essen oder im Tag-Nacht-Rhythmus feststellen. Die Tatsache eines bestehenden Diabetes allein beeinflusste den 2,3-DPG-Spiegel nicht. Solange der Diabetes in einem stabilen Zustand war, gleichgültig ob gut oder schlecht eingestellt, unterschied sich der mittlere 2,3-DPG-Spiegel nicht signifikant von den normalen Werten, wie die Meßwerte der Gruppen II und IV in Tabelle I zeigen. Sowohl die Gruppe der 10 seit langer Zeit hyperglykämischen, nichtazidotischen Diabetiker (Gruppe II) als auch die Gruppe der 13 Diabetiker, die seit mindestens einer Woche vor der Untersuchung gut eingestellt waren (Gruppe IV), zeigten gut übereinstimmende Werte mit der Gruppe I der Normalpersonen in bezug auf den 2,3-DPG-Spiegel. Tabelle I verdeutlicht darüber hinaus, daß die Hämoglobinkonzentration im Blut (außer Gruppe V) ebenso wie die Konzentration an ATP pro Gramm Hämoglobin und die Blut-pH-Werte bei all diesen Patienten in etwa konstant war.

Es zeigte sich jedoch eine signifikante Änderung des 2,3-DPG-Spiegels, sobald ein Wechsel in der metabolischen Kontrolle des Diabetes eintrat. Die 10 hyperglykämischen, nichtazidotischen Patienten der Gruppe II, die vor der Behandlung im Krankenhaus normale 2,3-DPG-Werte gehabt hatten, bekamen nach der Normalisierung ihres Blutzuckers (Gruppe III) einen signifikanten Abfall ihres 2,3-DPG-Spiegels. Abbildung 1 veranschaulicht den Verlauf der 2,3-DPG- und Blutzuckerwerte eines der Patienten von Gruppe II, die alle das gleiche Verhalten aufwiesen. Parallel zum Absinken des Blutzucker-

Tabelle I

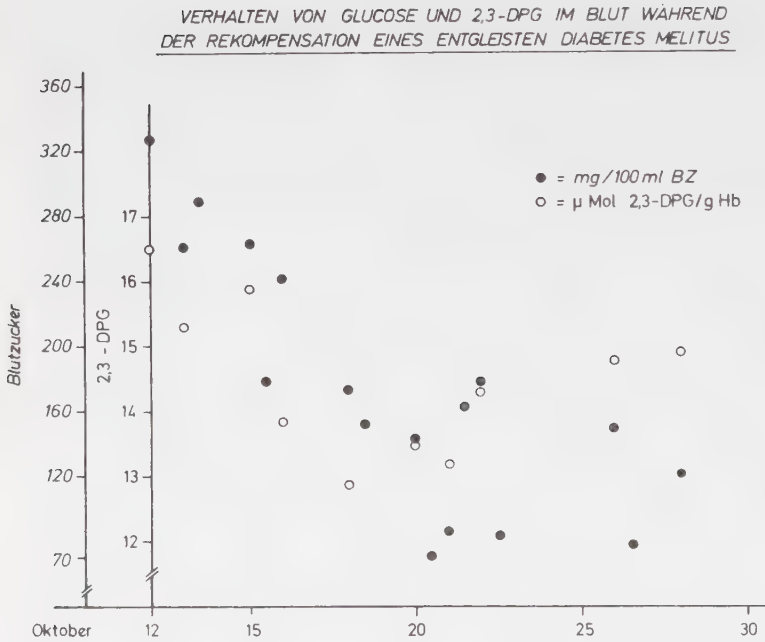
2, 3-DPG- und ATP-Gehalt des Erythrozyten bei Normalpersonen und ausgewählten Gruppen von Diabetikern

Gruppe	n	Blutglukose mg/100 ml	Hb g/100 ml	ATP umol/g Hb	2, 3-DPG umol/g Hb	pH	p ⁺
I	14 Normal- personen	109 ± 5	15.4 ± 0.3	3.27 ± 0.11	16.82 ± 0.66	7.36 ± 0.01	<0.01
II	10 Diabetiker	312 ± 17	15.1 ± 0.3	3.52 ± 0.38	16.22 ± 0.55	7.37 ± 0.01	<0.001
III	10 Diabetiker	148 ± 7	15.6 ± 0.4	3.12 ± 0.34	13.97 ± 0.64	7.37 ± 0.01	
IV	13 Diabetiker	153 ± 9	15.1 ± 0.4	3.36 ± 0.17	16.37 ± 0.72	7.37 ± 0.01	<0.01
V	11 Diabetiker [*]	142 ± 6	14.0 ± 0.4	3.61 ± 0.38	17.68 ± 0.60	7.37 ± 0.01	<0.005

* Diabetiker mit Retinopathie

⁺p-Werte im Vergleich zu Gruppe III

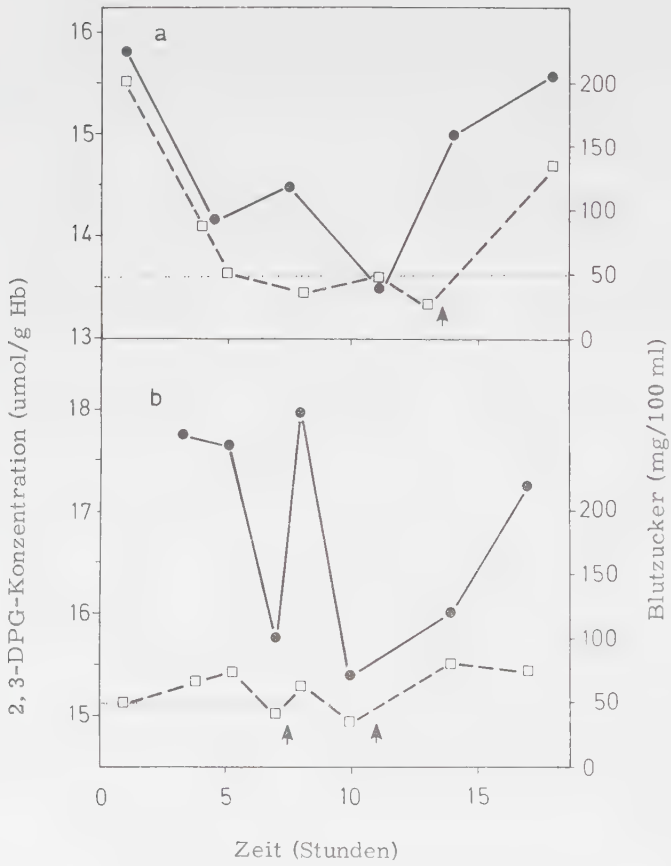
Abbildung 1



Spiegels verlief eine stufenweise Abnahme der 2,3-DPG-Konzentration der Erythrozyten. Nach einigen Tagen erreichte die 2,3-DPG-Konzentration einen Minimal-Wert von $13 \mu\text{mol}$ pro Gramm Hämoglobin und stieg daraufhin wieder auf die normalen Ausgangswerte an, obwohl die Blutzuckerkonzentration niedrig blieb. Diese Abnahme in der 2,3-DPG-Konzentration in Verbindung mit Änderungen der Blutglukose war signifikant im Vergleich zu Normalpersonen wie auch zu stabilen gut eingestellten Diabetikern (p-Werte in Tabelle I). Eine andere Gruppe von 11 Diabetikern (Gruppe V), die bereits an einer diabetischen Retinopathie litten und einige Zeit gut eingestellt waren, zeigten einen mittleren 2,3-DPG-Spiegel von $17,68 \pm 0,6 \mu\text{mol}$ 2,3-DPG pro Gramm Hämoglobin (Tabelle I). Dieser Wert ist etwas höher im Vergleich zu Normalpersonen oder Diabetikern ohne Anzeichen für eine Angiopathie. Gleichzeitig konnten aber bei dieser Gruppe (Gruppe V) auch leicht erniedrigte Hämoglobin-Spiegel von $14,0 \pm 0,4$ Gramm pro 100 ml Blut beobachtet werden, obwohl keiner dieser Patienten an einer Anämie litt. Aus der Literatur (61) ist bekannt, daß sich der 2,3-DPG-Spiegel pro Gramm Hb-Änderung um $0,23 \text{ m mol/l}$ erhöht. So läßt sich der Anstieg des 2,3-DPG-Spiegels bei diesen Patienten durch den Abfall der Hämoglobin-Konzentration im Blut erklären.

Es wäre interessant gewesen, den Effekt von Änderungen in der Blutglukosekonzentration während einer Hypoglykämie auf den 2,3-DPG-Gehalt in den Erythrozyten zu erforschen. Dies erwies sich aber in der Praxis als schwierig, denn Diabetiker, die vor kurzer Zeit stark hyperglykämisch gewesen waren oder die eine deutliche reaktive Hyperglykämie im Gefolge des Unterzuckerschocks entwickelten, waren für die Untersuchungen ungeeignet. Es ergab sich jedoch die Gelegenheit, Untersuchungen bei zwei Patienten mit spontanen Hypoglykämien anzustellen. Wie sich später herausstellte, wurden die hypoglykämischen Anfälle bei beiden durch einen Inselzell-Tumor verursacht. Während diese Patienten aus diagnostischen Gründen über Nacht fasteten und sich über Stunden allmählich eine Hypoglykämie entwickelte, wurden sie auf etwaige 2,3-DPG-Konzentrationsänderungen im Blut hin untersucht. Wie Abbildung 2 zeigt, ist eine schwere

Abbildung 2



Hypoglykämie auch mit einer Abnahme des 2,3-DPG-Gehalts der Erythrozyten vergesellschaftet. Bei einem Patienten (Abbildung 2 a) fiel die Blut-Glukose von 200 auf 35 mg/100 ml und gleichzeitig verminderte sich die 2,3-DPG-Konzentration um etwa 20 Prozent. Eine etwa gleiche Änderung des 2,3-DPG-Gehalts wurde auch beim zweiten Patienten beobachtet (Abbildung 2 b), obwohl sich der Blutzucker nur um 40 mg % veränderte, dabei allerdings auf 30 mg % absank.

In-vitro-Versuche

Der Einfluß von Veränderungen der Blut-Glukosekonzentration auf den Gehalt der Erythrozyten an 2,3-DPG in vitro wurde an Blut von Gesunden und Diabetikern untersucht. Es wurde das Dialyse-System benutzt, das im einzelnen im Abschnitt "Methoden" beschrieben wurde. Das Blut von sieben Normalpersonen (Gruppe VI) wurde inkubiert und dialysiert entweder gegen 400 oder 80 mg/100 ml Glukose. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im 2,3-DPG-Spiegel zwischen den Inkubationen mit unterschiedlicher Glukosekonzentration während der siebenstündigen Inkubationsdauer (siehe Tabelle II). Das Blut von sechs metabolisch dekompensierten, jedoch nicht ketoazidotischen Diabetikern (Gruppe VII) (Blutzucker unmittelbar vor Beginn des Experiments zwischen 300 und 400 mg/100 ml) verhielt sich dagegen andersartig (siehe Tabelle III). Während die 2,3-DPG-Spiegel des gegen 400 mg/100 ml Glukose-Pufferlösung dialysierten Blutes über sieben Stunden konstant blieben, fielen bei niedrigen Glukose-Spiegeln (80 mg/100 ml) die 2,3-DPG-Konzentrationen über sieben Stunden stark ab (Abb. 3). Diese Ergebnisse stimmen mit den in-vivo-Beobachtungen - Senkung der Blutglukose bei hyperglykämisch entgleisten Diabetikern zieht einen Abfall des 2,3-DPG-Spiegels nach sich - gut überein. Eine weitere Gruppe (VIII) von zwei gut eingestellten Diabetikern zeigte bei niedrigen Glukosekonzentrationen über sieben Stunden eine etwas größere 2,3-DPG-Abnahme als bei hohen Glukose-Spiegeln (siehe Tabelle IV). In diesem Fall wurden die relativ "normalen" Blut-Glukosekonzentrationen (etwa 120 mg %) durch die Dialyse gegen eine etwa 80 mg %ige Glukoselösung immer noch, wenn auch weniger, gesenkt.

Weiterhin ist den Tabellen II - IV zu entnehmen, daß die Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten während des siebenstündigen Versuches einigermmaßen konstant blieb, wenn sie auch gegen Ende des Versuchs in allen Fällen leicht abnahm. Die Blutzuckerwerte stellten sich, wie die Messungen gleich nach Beginn des Experiments zeigen, schnell auf die Glukosekonzentrationen im Dialysat ein und waren 2 Stunden nach Beginn mit diesen im Gleichgewicht. Vorversuche haben

Tabelle II

Gruppe VI (Normale) n = 7.

a) Dialyse gegen 400 mg/100 ml Glukoselösung

Versuchs- dauer	$\mu\text{mol } 2,3 \text{ DPG/g Hb}$	Hb g/100 ml	BZ mg/100 ml	Glukosekonz. im Dialysat mg/100 ml	ATP $\mu\text{mol/g Hb}$
Start	$14,8 \pm 0,6$	$14,9 \pm 0,2$	172 ± 14	432 ± 26	$2,93 \pm 0,14$
2 Std.	$14,6 \pm 0,4$	$14,1 \pm 0,4$	309 ± 29	457 ± 30	$3,45 \pm 0,20$
5 Std.	$13,3 \pm 0,5$	$13,2 \pm 0,3$	349 ± 23	452 ± 31	$2,99 \pm 0,08$
7 Std.	$12,7 \pm 0,6$	$13,6 \pm 0,3$	358 ± 27	467 ± 42	$2,74 \pm 0,61$

b) Dialyse gegen 80 mg/100 ml Glukoselösung

Versuchs- dauer	$\mu\text{mol } 2,3 \text{ DPG/g Hb}$	Hb g/100 ml	BZ mg/100 ml	Glukosekonz. im Dialysat mg/100 ml	ATP $\mu\text{mol/g Hb}$
Start	$14,9 \pm 0,4$	$14,9 \pm 0,3$	67 ± 10	104 ± 6	$2,81 \pm 0,50$
2 Std.	$14,7 \pm 0,9$	$14,1 \pm 0,4$	69 ± 4	108 ± 10	$3,00 \pm 0,42$
5 Std.	$13,5 \pm 0,6$	$13,4 \pm 0,4$	68 ± 4	117 ± 10	$3,05 \pm 0,20$
7 Std.	$12,6 \pm 0,4$	$13,6 \pm 0,5$	76 ± 7	113 ± 10	$2,99 \pm 0,13$

Tabelle III

Gruppe VII (entgleiste Diabetiker) n = 6

a) Dialyse gegen 400 mg/100 ml Glukoselösung

Versuchs- dauer	$\mu\text{mol } 2, 3\text{-DPG/g Hb}$	Hb g/100 ml	BZ mg/100 ml	Glukosekonz. im Dialysat* mg/100 ml	ATP $\mu\text{mol/g Hb}$
Start	$15,08 \pm 1,02$	$15,1 \pm 0,4$	234 ± 7	506 ± 50	$3,51 \pm 0,48$
2 Std.	$14,66 \pm 0,82$	$14,3 \pm 0,6$	356 ± 34	596 ± 27	$3,66 \pm 0,53$
5 Std.	$15,23 \pm 0,99$	$13,2 \pm 0,4$	396 ± 39	590 ± 35	$3,30 \pm 3,30$
7 Std.	$14,63 \pm 0,66$	$13,2 \pm 0,4$	411 ± 42	615 ± 33	$3,19 \pm 0,54$

b) Dialyse gegen 80 mg/100 ml Glukoselösung

Versuchs- dauer	$\mu\text{mol } 2, 3\text{-DPG/g Hb}$	Hb g/100 ml	BZ mg/100 ml	Glukosekonz. im Dialysat mg/100 ml	ATP $\mu\text{mol/g Hb}$
Start	$15,58 \pm 0,75$	$14,7 \pm 0,3$	209 ± 16	120 ± 2	$3,48 \pm 0,25$
2 Std.	$14,65 \pm 0,18$	$13,4 \pm 0,4$	99 ± 6	138 ± 15	$3,53 \pm 0,42$
5 Std.	$*12,81 \pm 0,74$	$13,4 \pm 0,4$	79 ± 1	131 ± 7	$3,13 \pm 0,48$
7 Std.	$*11,58 \pm 0,53$	$12,9 \pm 0,3$	71 ± 3	129 ± 2	$3,29 \pm 0,26$

* p-Werte < 0,001

Abbildung 3

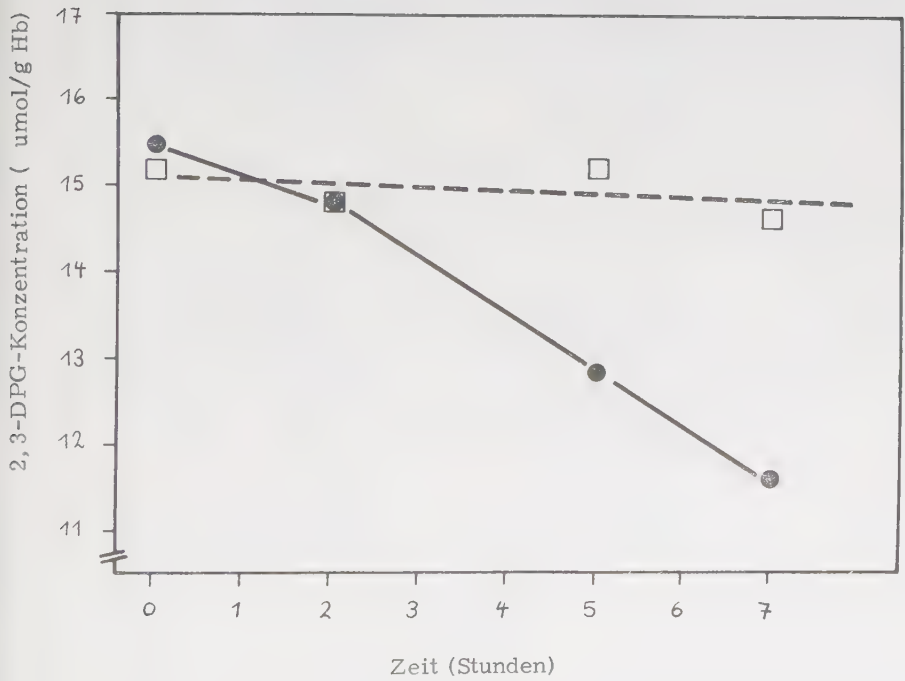


Tabelle IV

Gruppe VIII (gut eingestellte Diabetiker) n = 2

a) Dialyse gegen 400 mg/100 ml Glukoselösung

Versuchsdauer	$\mu\text{mol 2, 3 DPG/gHb}$	Hb g/100 ml
Start.	$18,85 \pm 0,15$	$13,7 \pm 0,5$
2 Std.	$18,05 \pm 0,55$	$13,1 \pm 0,3$
5 Std.	$17,90 \pm 0,10$	$12,7 \pm 0,2$
7 Std.	$15,95 \pm 0,75$	$11,6 \pm 0,4$

b) Dialyse gegen 80 mg/100 ml Glukoselösung

Versuchsdauer	$\mu\text{mol 2, 3 DPG/gHb}$	Hb g/100 ml
Start	$19,50 \pm 0,45$	$13,8 \pm 0,6$
2 Std.	$17,30 \pm 0,20$	$13,0 \pm 0,2$
5 Std.	$16,70 \pm 0,50$	$12,5 \pm 0,4$
7 Std.	$14,40 \pm 0,80$	$12,0 \pm 0,1$

gezeigt, daß dies etwa nach 15 Minuten der Fall ist. Die Glukosekonzentrationen im Dialysat stimmten zu Beginn der Versuche gut mit den vorher errechneten Sollwerten (80 und 400 mg %) überein, nahmen jedoch über die siebenstündige Versuchsdauer kontinuierlich zu, was sicherlich auf eine geringgradige Verdunstung des Puffergemisches im Erlenmeyer-Kolben zurückzuführen war.

Die ATP-Konzentrationen lagen in der Gruppe der entgleisten Diabetiker (VII) etwas höher als bei den Normalpersonen (Gruppe VI). Sie zeigten keine Veränderungen bei hoher bzw. niedriger Glukosedialyse. In allen Gruppen nahmen die ATP-Konzentrationen gegen Ende des Versuches leicht ab.

Versuche mit Insulin und Tolbutamid

Eine mögliche Beeinflussung des 2,3-DPG-Gehaltes der Erythrozyten durch Insulin oder Tolbutamid wurde in in-vitro-Experimenten untersucht, die im Kapitel "Methoden" beschrieben sind. Blutproben wurden bei Versuchsbeginn, nach 15 Minuten, 2 Stunden 15 Minuten, 4 Stunden 15 Minuten und 6 Stunden 15 Minuten entnommen. Tolbutamid oder Insulin wurden zugegeben, nachdem die ersten Blutproben bei Versuchsbeginn entnommen waren. Es wurde Blut von drei Normalpersonen (Gruppe IX), drei gut eingestellten Diabetikern (Gruppe X) und drei entgleisten Diabetikern (Gruppe XI) untersucht. Innerhalb einer jeden Gruppe wurden drei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt; es wurde dem Blut entweder nichts, Insulin oder Tolbutamid zugegeben (Konzentrationen siehe "Methoden").

Es ist bemerkenswert, daß sich auch in diesem einfachen System das bei Patienten und in Dialyseversuchen beobachtete Phänomen, nämlich der Einfluß einer Blutglukosekonzentrationsänderung auf den 2,3-DPG-Spiegel hyperglykämischen Blutes, wieder einstellte (Gruppe XI). Dieser Effekt zeigte sich in hyperglykämischem Blut ohne weiteren Zusatz, als auch nach Insulin- oder Tolbutamid-Zugabe (Tabellen VII*, Gruppe XI a, b, c).

In Gruppe IX und X, d. h. bei Normalpersonen und gut eingestellten Diabetikern ließ sich keine Abhängigkeit der 2,3-DPG-Konzentrationen von einer Veränderung des Blut-Glukose-Spiegels nachweisen (siehe Tabelle V* und VI*). Die 2,3-DPG-Spiegel nahmen zwar im Verlauf des Versuches ab, jedoch waren die Konzentrationsabnahmen bei hohen und niedrigen Glukosekonzentrationen durchwegs gleichsinnig. Innerhalb der Gruppen ergab sich keine signifikante 2,3-DPG-Änderung unter dem Einfluß von Tolbutamid oder Insulin. In Abbildung 4 und 5 sind die Versuche von allen drei Gruppen zusammenge-

* In den Tabellen V, VI und VII sind die im Verlauf des Versuchs erhaltenen Werte für das 2,3-DPG angegeben in Prozent der jeweiligen Ausgangswerte. Die Ausgangswerte sind in den Tabellen in Klammern aufgeführt.

Tabelle V

Gruppe IX (Normale)

Versuchsdauer	0	15'	2 Std. 15'	4 Std. 15'	6 Std. 15'
---------------	---	-----	------------	------------	------------

a) Normale n = 3

400 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (12,9)	97,7	87,0	88,4	88,4
Hb g/100 ml	14,9 ± 0,3	15,4 ± 0,3	16,1 ± 0,0	16,9 ± 0,1	19,5 ± 0,8

80 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (13,1)	95,3	93,0	93,0	85,5
Hb g/100 ml	15,6 ± 0,1	14,7 ± 0,8	16,3 ± 0,1	17,3 ± 0,3	19,0 ± 1,0

b) Normale + Insulin n = 3

400 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (14,0)	106,1	97,9	95,1	91,3
Hb g/100 ml	15,0 ± 0,6	14,9 ± 0,7	15,7 ± 0,8	16,6 ± 0,8	18,2 ± 1,2
ATP µmol/g Hb	3,34 ± 0,7	2,90 ± 0,77	3,31 ± 0,01	2,82 ± 0,14	3,43 ± 0,36

80 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (14,6)	93,9	93,9	88,3	84,8
Hb g/100 ml	14,8 ± 0,8	14,7 ± 0,7	15,9 ± 0,7	17,0 ± 0,8	19,1 ± 1,2
ATP µmol/g Hb	2,51 ± 0,3	3,30 ± 0,56	3,08 ± 0,03	2,74 ± 0,57	2,47 ± 0,01

c) Normale + Tolbutamid n = 3

400 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (16,3)	94,4	97,6	92,8	83,2
Hb g/100 ml	15,1 ± 1,5	14,3 ± 0,6	14,5 ± 0,3	14,5 ± 0,5	15,3 ± 0,6
ATP µmol/g Hb	3,84	4,20	4,37	3,69	4,36

80 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (15,9)	106,1	104,2	85,7	93,0
Hb g/100 ml	14,7 ± 1,6	13,5 ± 0,3	13,9 ± 0,3	14,4 ± 3,4	14,9 ± 0,1
ATP µmol/g Hb	3,26	4,45	4,32	3,36	3,21

Tabelle VI

Gruppe X (gut eingestellte Diabetiker)

Versuchsdauer	0	15'	2 Std. 15'	4 Std. 15'	6 Std. 15'
a) <u>gut eingestellte Diabetiker</u> n = 3					
400 mg/100 ml Glukosekonzentration					
2,3-DPG %	100 (13,6)	98,4	97,8	82,1	82,1
Hb g/100 ml	15,4 ± 2,6	15,4 ± 2,4	16,2 ± 2,6	17,3 ± 3,0	19,1 ± 4,2
80 mg/100 ml Glukosekonzentration					
2,3-DPG %	100 (13,3)	97,9	90,9	86,3	85,8
Hb g/100 ml	15,2 ± 2,3	15,2 ± 2,2	16,1 ± 2,4	17,2 ± 2,9	18,0 ± 2,6

b) gut eingestellte Diabetiker + Insulin n = 2

400 mg/100 ml Glukosekonzentration					
2,3-DPG %	100 (13,8)	102,8	96,1	93,3	83,4
Hb g/100 ml	16,0 ± 4,1	15,9 ± 3,6	17,2 ± 3,9	18,1 ± 4,8	20,5 ± 5,8
80 mg/100 ml Glukosekonzentration					
2,3-DPG %	100 (13,7)	96,1	94,1	86,0	86,9
Hb g/100 ml	15,7 ± 2,8	16,1 ± 3,5	17,2 ± 4,1	18,0 ± 4,7	18,8 ± 4,6

c) gut eingestellte Diabetiker + Tolbutamid n = 3

400 mg/100 ml Glukosekonzentration					
2,3-DPG %	100 (16,8)	98,0	89,9	90,3	80,4
Hb g/100 ml	13,1 ± 0,7	13,3 ± 0,8	13,7 ± 1,0	14,3 ± 0,8	15,2 ± 0,9
ATP µmol/gHb	2,73	2,08	2,88	2,38	2,26
80 mg/100 ml Glukosekonzentration					
2,3-DPG %	100 (16,9)	102,7	98,1	91,1	82,2
Hb g/100 ml	13,0 ± 0,6	13,0 ± 0,8	13,3 ± 0,8	13,8 ± 0,8	14,8 ± 0,8
ATP µmol/g Hb	4,11	3,25	4,10	4,44	3,68

Tabelle VII

Gruppe XI (entgleiste Diabetiker)

Versuchsdauer	0	15'	2 Std. 15'	4 Std. 15'	6 Std. 15'
---------------	---	-----	------------	------------	------------

a) entgleiste Diabetiker n = 3

400 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (14,7)	97,8	95,9	96,4	94,5
Hb g/100 ml	16,7 ± 1,2	17,0 ± 1,4	17,7 ± 0,4	18,7 ± 1,4	20,5 ± 1,4
ATP µmol/g Hb	3,43 ± 0,38	2,50 ± 0,49	2,71 ± 0,60	3,03 ± 0,62	3,41 ± 0,04

80 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (14,5)	98,5	88,2	91,0	82,8
Hb g/100 ml	17,1 ± 1,5	17,3 ± 1,7	18,0 ± 2,0	19,0 ± 1,5	21,0 ± 1,6
ATP µmol/g Hb	3,09 ± 0,13	3,12 ± 0,47	2,70 ± 0,20	3,24 ± 0,47	2,92 ± 0,07

b) entgleiste Diabetiker + Insulin n = 3

400 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (15,0)	108,0	99,2	90,6	90,0
Hb g/100 ml	14,4 ± 0,8	14,2 ± 0,8	15,0 ± 0,9	16,4 ± 0,8	18,1 ± 1,7
ATP µmol/g Hb	3,54 ± 0,13	3,52 ± 0,09	3,61 ± 0,26	3,50 ± 0,04	3,58 ± 0,32

80 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (15,5)	100	87,2	92,1	87,2
Hb g/100 ml	14,7 ± 1,4	14,7 ± 1,2	15,5 ± 1,4	16,2 ± 1,6	18,2 ± 1,9
ATP µmol/g Hb	2,92 ± 0,09	2,90 ± 0,09	2,79 ± 0,18	2,96 ± 0,81	3,32 ± 0,40

c) entgleiste Diabetiker + Tolbutamid n = 3

400 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (15,4)	100,6	104,9	98,7	91,9
Hb g/100 ml	12,6 ± 0,6	12,7 ± 0,7	13,2 ± 1,0	13,6 ± 0,4	14,4 ± 0,5
ATP µmol/g Hb	3,14 ± 0,20	2,99 ± 0,15	2,51 ± 0,28	2,77 ± 0,18	3,54 ± 0,18

80 mg/100 ml Glukosekonzentration

2,3-DPG %	100 (16,1)	100	100	95,0	86,2
Hb g/100 ml	12,7 ± 0,8	12,7 ± 1,0	12,9 ± 1,0	13,7 ± 1,0	14,3 ± 0,8
ATP µmol/g Hb	3,60 ± 0,36	3,27 ± 0,17	3,48 ± 0,25	2,51 ± 0,24	2,95 ± 0,11

Abbildung 4

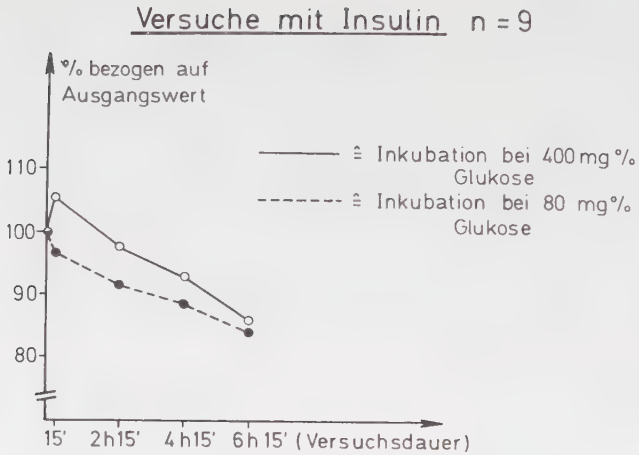
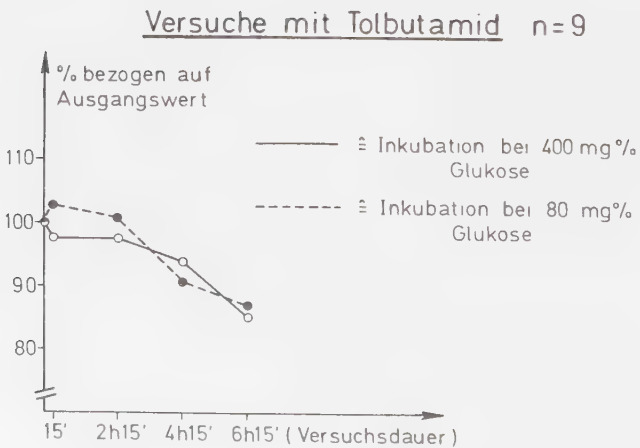


Abbildung 5

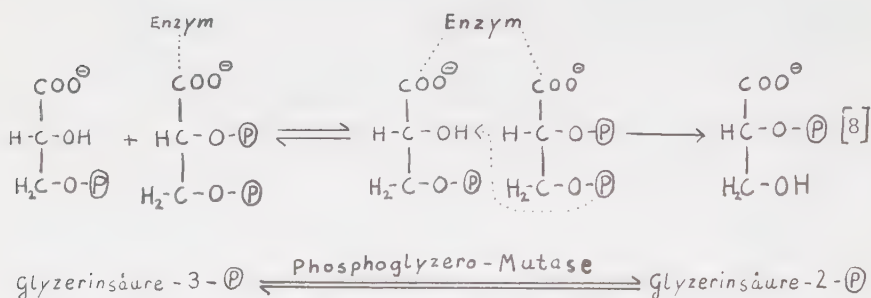


faßt und graphisch dargestellt. Daraus geht hervor, daß sich weder die Kurven bei hohen Glukosekonzentrationen (400 mg/100 ml) von denen bei niedrigen (80 mg/100 ml), noch die Kurven nach Insulinzugabe von denen nach Tolbutamidzugabe unterscheiden. Es ist also zu folgern, daß sowohl Insulin als auch Tolbutamid keinen Einfluß auf die 2,3-DPG-Konzentration des Erythrozyten haben. Aus den Tabellen V - VII ersieht man, daß die Hämoglobinkonzentration in allen Fällen im Verlauf des Versuchs zunahm; dies erklärt sich durch die geringgradige Verdunstung aus den unverschlossenen Zentrifugengläsern während der über sechsständigen Versuchsdauer. Die Messungen der ATP-Konzentrationen ergaben keine signifikanten Änderungen sowohl nach Insulin- oder Tolbutamid-Zugabe als auch bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen.

DISKUSSION DER LITERATUR

Die Rolle des 2,3-Diphosphoglyzerats im Stoffwechsel

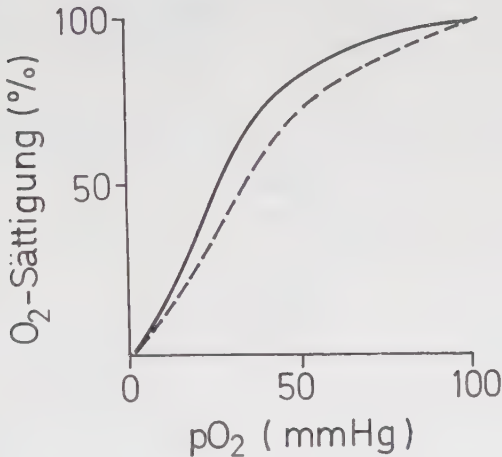
2,3-Diphosphoglyzerat entsteht im unteren Teil der Glykolyse, und zwar bei der Umlagerung von 3-Phosphoglyzerat zu 2-Phosphoglyzerat (34). Enzym bei dieser Reaktion ist die Phosphoglyzerat-Mutase, 2,3-DPG beeinflusst die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Reaktion und ist ein Zwischenprodukt wie in der folgenden Gleichung dargestellt [8].



Das 3-Phosphat wird hierbei vom Enzym-Diphosphat-Komplex phosphoryliert und das dephosphorylierte Koenzym abdissoziiert (2-Phosphoglyzerat). Das 2,3-DPG wirkt wie ein "Koenzym".

Da bei dieser Reaktion das 2,3-DPG nur in geringer Menge vorhanden sein muß, ließ es sich bis vor kurzem nicht erklären, warum das 2,3-DPG im Erythrozyten den Hauptanteil der organischen Phosphate ausmachen sollte mit einer Konzentration von etwas über 15 $\mu\text{mol pro g Hb}$ und warum sich überhaupt die Konzentration an 2,3-DPG im Erythrozyten von der in anderen Körperzellen unterscheiden sollte. Diese Tatsache fand eine Erklärung, als Benesch und Benesch (9), und Chanutin und Curnish (20) 1967 einen Zusammenhang zwischen der 2,3-DPG Konzentration im Erythrozyten und der Hämoglobin-Sauerstoffbindungskurve herstellen konnten. 2,3-DPG erniedrigt

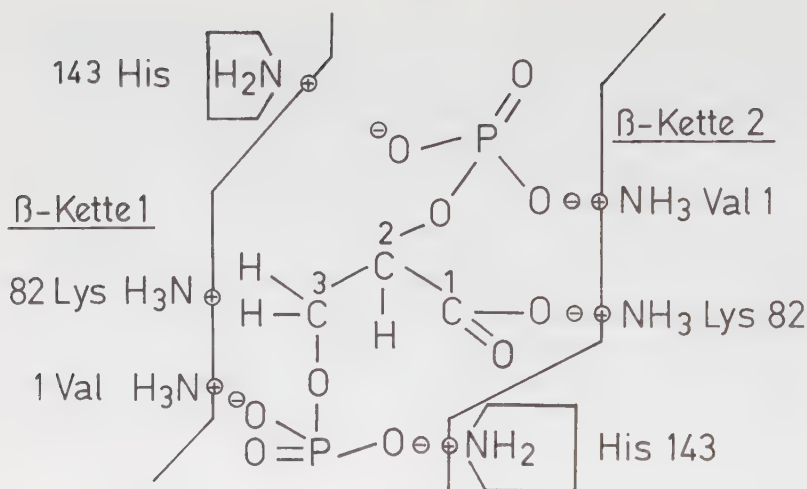
die Affinität des Hb für O_2 , indem es die Struktur der deoxygenierten Form begünstigt. Eine höhere 2,3-DPG Konzentration im Erythrozyten bewirkt eine Rechtsverschiebung der Hb- O_2 -Bindungskurve. (---)



Das heißt, bei gleichem Sauerstoff-Partialdruck dissoziiert mehr O_2 vom Hb ab, woraus eine bessere Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff resultiert.

Die Bindung des 2,3-DPG an das Hämoglobin

Das 2,3-DPG wird praktisch ausschließlich vom reduzierten Hämoglobin gebunden (50, 68, 6, 49, 27, 10, 11). Der freie Platz zwischen den β -Ketten des Hb-Moleküls, der sich mit dem Zustand der Oxygenierung ändert, reguliert die Bindungsaffinität zum 2,3-DPG (6). Duhm (25) zeichnete nach den kristallographischen Röntgenuntersuchungen von Perutz und Arnone (46, 3) folgendes Modell für den möglichen Sitz der 2,3-DPG-Bindung mit den zwei β -Ketten innerhalb der sogenannten "zentralen Höhle" des Deoxyhämoglobin-Tetramers.



Die fünf Anionen-Gruppen des 2,3-DPG bilden Salzbrücken mit positiv geladenen Aminosäuren in der zentralen Höhle des Deoxyhämoglobins. Als Bindungssitz bieten sich die endständigen Aminogruppen der zwei Valine, die ϵ -Amino-Gruppe eines der zwei Lysine in Position 82 und die Histidine in Position 143 der zwei β -Ketten an. Aus sterischen Gründen ist das 2,3-DPG nur zu einem geringen Teil an das oxygenierte Hämoglobin gebunden, da bei der Oxygenierung die beiden Valine mit den endständigen Aminogruppen weiter entfernt voneinander zu liegen kommen und es für das 2,3-DPG-Molekül unmöglich machen, mit beiden von ihnen eine Bindung einzugehen. Damit übereinstimmend fand Garby (27), daß die Bindung des 2,3-DPG-Moleküls an das Hämoglobin erleichtert ist, wenn das zweite, dritte und vierte Sauerstoff-Molekül vom Hämoglobin-Molekül abdissoziiert ist. Früher schon erklärte Benesch (10) die Tatsache, daß 2,3-DPG von vollständig oxygeniertem Hb kaum gebunden wird, folgendermaßen: Das Verhältnis zwischen der Hämoglobin-Affinität für CO und der für O₂ beträgt etwa 200. Er inkubierte Hämoglobin in ein Milieu, das das Hämoglobin vollständig mit O₂ und CO absättigte und stellte fest, daß sich das Verhältnis hämoglobingebundenes Kohlenmonoxid zu hämoglobingebundenem Sauerstoff unter dem Einfluß einer genügend hohen 2,3-DPG-Konzentration nicht veränderte. Die Reaktion von O₂ und 2,3-DPG mit Hämoglobin ist kompetitiv, obwohl beide Moleküle verschiedene Plätze am Hb-Molekül besetzen (11).

Änderung der Konzentration des 2,3-DPG bei verschiedenen Krankheiten

Während die Konzentration des 2,3-DPG im Erythrozyten bei Gesunden eine ziemlich konstante Größe ist, kann sie bei verschiedenen Krankheiten oder bei bestimmten Bedingungen stark variieren.

Grundsätzlich läßt sich sagen, daß bei vielen Krankheiten, die eine Hypoxie des Gewebes verursachen, ein Anstieg des 2,3-DPG im Erythrozyten beobachtet werden kann (61, 68, 42, 65, 56). Es ist dies wahrscheinlich ein Kompensationsmechanismus, da das an das Hämoglobin gebundene O_2 durch die von der erhöhten 2,3-DPG-Konzentration, wie oben beschrieben, verursachte Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve im Gewebe besser ausgenutzt werden kann und die O_2 -Versorgung verbessert wird.

So hat Torrance (61) beschrieben, daß bei Anämie pro Gramm Hämoglobin-Abfall das 2,3-DPG um 0,23 mM/l und der p_{50} (Sauerstoffdruck, bei dem die Hälfte der Hämoglobin-Moleküle in oxygenierter Form vorliegen) um 0,3 mm anstieg; er vermutete, daß die durch den 2,3-DPG-Anstieg induzierten Änderungen in der Hb-Affinität für Sauerstoff das Sauerstoff-Defizit bei Anämie bis zur Hälfte kompensieren könnten.

Bei einem Kollektiv von 39 Patienten mit nichtzyanotischen Herzerkrankungen (68) wurde ein progressiver Abfall in der Hämoglobin-Sauerstoff-Affinität bei Verschlechterung der Herzfunktion gefunden. Woodson gab eine zweifache Ursache für die Änderung in der Hb- O_2 -Affinität an. Bei vermindertem Verhältnis oxygeniertes Hämoglobin zu reduziertem Hämoglobin wird

- 1) mehr 2,3-DPG an das vermehrte reduzierte Hb gebunden, was die Synthese von 2,3-DPG zur Folge hat;
- 2) ist reduziertes Hämoglobin weniger sauer; es tritt also eine relative Alkalose im Erythrozyten auf, was, wie weiter unten noch

beschrieben wird, ebenfalls die Synthese von 2,3-DPG stimuliert.

Hierbei erscheint also der Spiegel an reduziertem Hämoglobin als ein wichtiger in-vivo-Regulator für die 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten, der eine Änderung in der Hämoglobin-Sauerstoff-Affinität nach sich zieht.

Bei Versuchen an Patienten mit angeborener Methämoglobinämie (65) wurden hohe 2,3-DPG-Werte gefunden, die sich nach Behandlung normalisierten.

Auch bei Schilddrüsenkrankheiten wird die Verschiebung der Sauerstoffbindungskurve durch Erhöhung der intraerythrozytären 2,3-DPG-Konzentration hervorgerufen. Snyder (56) konnte zeigen, daß eine Inkubation normaler Erythrozyten mit Schilddrüsenhormon eine 2,3-DPG-Erhöhung verursacht. Er nahm an, daß das Schilddrüsen-Hormon die Diphosphoglyzerat-Mutase stimuliert, was eine 2,3-DPG-Konzentrationserhöhung erklärlich macht.

2,3-Diphosphoglyzerat-Spiegel und Wasserstoffionenkonzentration im Erythrozyten

Von größter Wichtigkeit für den 2,3-DPG-Spiegel im Erythrozyten ist der pH-Wert (1, 49, 7, 68, 18, 22). So zieht ein Abfall des pH-Wertes einen 2,3-DPG-Konzentrationsabfall nach sich, bei alkalischer Stoffwechsellaage ist mit einer Zunahme des 2,3-DPG zu rechnen. Von Alberti und Emerson (1) wurde ein sehr starker 2,3-DPG-Abfall bei diabetischer Ketoazidose beschrieben, der mit dem Absinken des pH-Wertes korreliert. Bei Patienten mit einem arteriellen pH-Wert zwischen 6,9 und 7,0 ergaben sich 2,3-DPG-Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,0 mmol/Liter Erythrozyten (im Vergleich zu normalen 2,3-DPG-Konzentrationen von 4,5 mmol/l). Dieser pH-bedingte 2,3-DPG-Abfall und die damit verbundene Linksverschiebung der

O_2 -Bindungskurve wirkt dem Bohr-Effekt entgegen, auch quantitativ, was zu einer nahezu konstanten O_2 -Affinität zu Hb bei niedrigen pH-Werten führt (49). Während aber der Bohr-Effekt sofort auftritt, ist der 2,3-DPG-Effekt auf die O_2 -Bindungskurve bedeutend träger; das bedeutet, wenn eine metabolische Azidose durch Gabe von Bikarbonat behandelt wird, so steigt der pH-Wert rasch an, die durch den Bohr-Effekt verursachte Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve fällt weg, das 2,3-DPG steigt jedoch nicht sofort an, sondern stellt sich nur langsam auf die neuen pH-Verhältnisse ein und verursacht dadurch eine länger bestehende Linksverschiebung der O_2 -Bindungskurve, was ja die Sauerstoff-Freisetzung im Gewebe beeinträchtigt.

Durch Inkubation menschlicher Erythrozyten mit Inosin, Pyruvat und anorganischen Phosphaten kann die 2,3-DPG-Konzentration auf das fünffache, nämlich bis zu 24 $\mu\text{mol/g}$ Erythrozyten angehoben werden (22). Durch das Anwachsen der nicht membrandurchlässigen Anionen wird das Donnan-Gleichgewicht verschoben, was ein Absinken des intrazellulären pH-Werts zur Folge hat. Dieser Mechanismus limitiert das weitere Ansteigen der 2,3-DPG-Konzentration.

Aus diesen Beispielen wird ersichtlich, daß der elementare Faktor für Änderungen in der 2,3-DPG-Konzentration der pH-Wert ist. Zwischen pH 6,9 und 8,0 ist die 2,3-DPG-Bindung an das reduzierte Hämoglobin linear abhängig vom pH-Wert (18).

Nach Berechnungen von Astrup und Rörth (7) ruht eine Änderung des intraerythrozytären pH-Wertes um 0,01 (im Bereich von 7,10 - 7,30) eine 2,3-DPG-Konzentrationsänderung von 0,04 mol/mol Hb hervor.

Auch die Anpassung des intraerythrozytären 2,3-DPG-Spiegels an große Höhen läßt sich auf einen pH-Effekt zurückführen. Die in 3500 m verminderte O_2 -Sättigung des Hämoglobins ruft einen pH-Anstieg von 7,40 auf 7,43 - 7,44 hervor, was wiederum einen Anstieg des 2,3-DPG-Spiegels um 12 - 16 % erwarten läßt (7). Schweigart (54) hat beobachtet, daß die 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten am Tage um 0,3 mMol/l höher ist als nachts. Im Vergleich zu un-

trainierten Menschen haben Trainierte eine um 0,7 mMol/l höhere 2,3-DPG-Konzentration. Diese 2,3-DPG-Erhöhungen sind mit einer Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve verbunden.

Verhalten des 2,3-DPG in Blutkonserven

Wird Blut in ACD- oder CPD-Lösungen aufbewahrt, so zeigt sich, daß bereits nach zwei Wochen 65 - 85 % des 2,3-DPG verschwunden sind (45, 12). Dabei ist die 2,3-DPG-Zerfallsrate stark pH-abhängig. In alkalischeren Lösungen bleibt der 2,3-DPG-Spiegel länger (etwa 21 Tage) konstant, dafür nimmt das ATP, das bei pH 7,4 relativ konstant war, stark ab. Fügt man kleine Mengen von Pyruvat und Adenin hinzu, so bleibt das ATP auch in Medien mit leicht alkalischem pH-Wert haltbar. Werden nun in CPD- und ACD-Lösungen gespeicherte Erythrozyten in frisches Plasma inkubiert, so zeigt sich, daß der ATP-Spiegel relativ konstant bleibt, das 2,3-DPG in 8 Stunden nur um ein Drittel des während der Aufbewahrung erlittenen Verlustes regeneriert wird, was die Trägheit der 2,3-DPG-Konzentrationsänderung unter veränderten metabolischen Verhältnissen von neuem beleuchtet. Dies hat zur Folge, daß konserviertes Blut für viele Stunden nach der Reinfusion die Sauerstoffabgabe im Gewebe nicht sicher gewährleisten kann (12).

Wechselwirkungen zwischen 2,3-DPG-Konzentration und Glykolyse

Von Beutler wurde der Einfluß von physiologischen 2,3-DPG-Konzentrationen auf die Aktivität aller glykolytischen Enzyme des Erythrozyten untersucht (14). Das 2,3-DPG hemmt zu 75 % die Phosphogluco-Mutase kompetitiv mit Glukose, die Phosphofruktokinase kompetitiv mit Fruktose-6-Phosphat, die Aldolase kompetitiv mit

Fruktose-1-6-di-Phosphat, zu 50 % die Hexokinase kompetitiv mit ATP und zu 25 % die Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase nicht kompetitiv. Es ist vielfach beschrieben worden, daß eine Stimulation der Glykolyse mit einem 2,3-DPG-Anstieg einhergeht (1, 61, 6). Die Glykolyse wird zum Beispiel auch durch die Deoxygenierung des Hämoglobin-Moleküls angeregt, was ja, wie oben beschrieben, die 2,3-DPG-Konzentration ebenfalls ansteigen läßt. Auch die Zugabe von Inosin zu gespeichertem Blut stimuliert die Glykolyse und ruft eine 2,3-DPG-Erhöhung hervor (6). Andererseits wird bei diabetischer Ketoazidose bei fehlendem anorganischem Phosphat, das Kofaktor für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ist, die intraerythrozytäre Glykolyse gestoppt; in diesem Fall können stark erniedrigte 2,3-DPG-Werte beobachtet werden.

Der Erythrozyten-Stoffwechsel

Der Stoffwechsel des reifen Erythrozyten weist einige Besonderheiten auf, die ihn von dem in anderen Körperzellen und auch vom heranwachsenden Erythrozyten, dem Retikulozyten, sehr wohl unterscheiden. Während der Retikulozyt noch eine bestimmte Menge Protein bilden kann, verliert der Erythrozyt mit Verlust des Retikulums jede Fähigkeit, Protein und Lipide zu synthetisieren (13); jedoch kann der reife Erythrozyt noch Glutathion, Pyridin-Nukleotide und bei Vorhandensein von Adenin Adenin-Nukleotide bilden. Während des Reifungsprozesses verliert der Erythrozyt auch seine Mitochondrien, so daß im reifen Erythrozyten keine Oxydation mehr von Pyruvat im Zitratzyklus, der ja in den Mitochondrien abläuft, stattfindet (13, 59). Um Ionen-Gradienten durch die Zellmembran zu gewährleisten, das Eisen im Hämoglobinmolekül in der aktiven, 2wertigen Form und das Glutathion und andere SH-Gruppen im Erythrozyten in der reduzierten Form zu erhalten, bedarf es Energie. Diese Energie bezieht der Erythrozyt aus dem Abbau der Glukose (13, 59), die entweder den Embden-Meyerhof-Stoffwechselweg oder den Hexose-Monophosphat-

Weg durchläuft. Der Hexose-Monophosphat-Weg oder Pentose-Phosphat-Zyklus ist der direkte oxidative Stoffwechselweg des Glukose-Abbaus. Unter normalen Bedingungen ist dieser Weg wenig begünstigt (13, 58, 59). Bei in-vitro-Versuchen (59) ergab sich, daß 11 % der Glukose im Pentose-Phosphat-Zyklus abgebaut werden. In diesem Stoffwechselweg wird aber NADPH gewonnen, das als Wasserstoffdonator in verschiedenen für die rote Zelle wichtigen enzymgebundenen Prozessen benötigt wird, einschließlich der Reduktion von Methämoglobin und teilweise auch der Reduktion von oxydiertem Glutathion (58, 59). Der Pentose-Phosphat-Zyklus ist auch allein verantwortlich für die Fähigkeit des reifen Erythrozyten, Sauerstoff zu verbrauchen und Kohlendioxid zu produzieren (58). Unter physiologischen Bedingungen ist aber der Glukose-Abbau im anaeroben Embden-Meyerhof-Mechanismus der weitaus wichtigere. Die hier freiwerdende Energie wird in Form von energiereichen Phosphaten durch Phosphorylierung des ADP zum ATP gespeichert. Das energiereiche ATP wird im Erythrozyten teilweise für den aktiven Natrium- und Kalium-Transport benötigt. Es wird vermutet (59), daß die Energie des ATP in osmotische Arbeit umgewandelt wird. Phosphorsäuren oder Phosphoproteine könnten als Trägersubstanzen fungieren, die zyklische und vielleicht reziproke Änderungen in der Affinität für Na^+ - und K^+ -Ionen besitzen.

Die Glukose dringt in den Erythrozyten durch erleichterte Diffusion ein, ein Vorgang, der im Gegensatz zu anderen Geweben, z. B. Fettzellen, Muskelzellen, nicht mit Hilfe von Insulin abläuft. Ebenfalls durch Diffusion dringt Phosphat in die Zelle ein, das rasch in organische Diester eingebaut wird (59). Daher ist die Höhe der Phosphataufnahme abhängig von der Glykolyserate. Der relativ stabile Diester, 2,3-DPG, ist wie schon erwähnt im Erythrozyten hoch konzentriert. Er dient neben anderen wichtigen Aufgaben, die schon beschrieben sind, als Phosphat-Depot. Unter Glukosemangel wird dieses Depot ausgeschöpft, und das 2,3-DPG zu Pyruvat und Laktat abgebaut, wobei ATP gebildet wird (59, 26, 62).

Nach Rose (52) hat die Glykolyse im erwachsenen Erythrozyten min-

destens drei elementare Funktionen:

- 1) In der Glykolyse wird ATP produziert, das für den Ionen-Transport und die Verrichtung von synthetischer Arbeit wichtig ist.
- 2) Es werden hohe 2,3-DPG-Spiegel aufrechterhalten.
- 3) Es werden reduzierende Äquivalente für die Aufrechterhaltung von Glutathion und Häm im reduzierten Zustand erzeugt.

Die Regulation der Glykolyse

Wie wird nun die Glykolyse reguliert? Das reibungslose Ablaufen des Glukoseabbaus setzt zunächst einmal die Glukose selbst und zum anderen das Vorhandensein aller Enzyme mit Coenzymen, die für den aeroben oder anaeroben Glukoseabbau notwendig sind, voraus. Das erste Enzym im Embden-Meyerhof-Abbau ist die Hexokinase. Nach Rapoport (47) findet sich eine direkte Abhängigkeit der Hexokinaseaktivität von der Glukosekonzentration, die fast immer im Sättigungsbereich liegt, sowie von Magnesium und ATP, deren Konzentration unterhalb der Sättigung, im Regulationsbereich liegt. Die unmittelbaren Produkte, Glukose-6-Phosphat und ADP, aber auch ATP und Magnesium, falls sie im Überschuß vorliegen, sowie das reaktionsferne 2,3-DPG wirken hemmend auf die Hexokinase. Die Aktivität aller Enzyme der Glykolyse wird von den Zwischenprodukten, sei es als Ausgangssubstanz der speziellen Reaktion, als Reaktionsprodukt oder als reaktionsferner Metabolit durch den allosterischen Effekt, beeinflusst. Eine andere Möglichkeit der Regulation des Glukoseabbaus liegt in der sogenannten Schrittmacherreaktion (34, 47). Solche Schrittmacherreaktionen sind besonders wichtige Kontrollstellen des Stoffwechsels, da ihre Beeinflussung (Aktivierung oder Hemmung) die oberhalb und unterhalb gelegenen Schritte mitbetrifft, die sich den veränderten Durchflüssen an der Staustelle anpassen. Das begrenzende Element einer Schrittmacherreaktion können Enzym, Koenzym, Substrat,

Produkt, reaktionsferner Metabolit, Effektor oder eine Kombination dieser Faktoren sein. Nach Karlson (34) ist im Embden-Meyerhof-Abbau die Phosphorylierung des Fruktose-6-Phosphats durch die Phosphofruktokinase zum Fruktose-1,6-diphosphat die Schrittmacherreaktion. Diese Reaktion verbraucht ATP, die Phosphatübertragung ist praktisch nicht umkehrbar (34, 37), die Aktivität der Phosphofruktokinase wird vom ATP-ADP-System allosterisch kontrolliert. Da diese Reaktion stark exergonisch ist, ist sie weitgehend irreversibel, während die Schritte davor und danach reversibel sind und die Metabolitkonzentrationen dort nahezu den Gleichgewichtskonzentrationen entsprechen. Rapoport (47) vermutet hingegen, daß die erste Reaktion, die Hexokinase-Reaktion, die Schrittmacherreaktion der Glykolyse sei. Diese Vermutung wird unterstützt von der Tatsache, daß die Hexokinase und die Glykolyse bei der Reifung des Erythrozyten parallel absinken. Weiter ist interessant, daß Glykolyse und Hexokinaseaktivität gleichsinnige pH-Abhängigkeit zeigen, was allerdings auch für die Phosphofruktokinase zutrifft. Wie wichtig das Vorhandensein genügend hoher Enzym-Spiegel für die Glykolyse und für den Fortbestand des Erythrozyten ist, kann man aus den Auswirkungen des angeborenen Mangels verschiedener glykolytischer Enzyme im Erythrozyten ersehen (63). Eine erbliche hämolytische Anämie kann auf der Synthese eines abnormalen Hämoglobins, auf der Unfähigkeit, selbst die Globin-Ketten des Hämoglobins zu bilden, auf Membrandefekten und eben auch auf angeborenen Mangelercheinungen im Enzymmuster des Erythrozyten basieren. So ist der angeborene Mangel an Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase die häufigste Ursache der hämolytischen Anämie in bezug auf erbliche Enzymdefekte im Erythrozyten (63). Als Ursache für hämolytische Anämien konnte aber auch ein angeborener Mangel an Triosephosphat-Isomerase, Hexokinase, Glukose-Phosphat-Isomerase, Phosphoglyzerat-Kinase und Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase gefunden werden.

Besonders die Retikulozyten sprechen sehr fein auf Änderungen im Enzymmuster des Erythrozyten an, so hat Pyruvat-Kinase-Mangel im Erythrozyten die sofortige Isolierung und Zerstörung der Retikulozyten durch das retikuloendotheliale System zur Folge (17, 39). Rei-

fere Erythrozyten überleben trotz Pyruvat-Kinase-Mangels, der hier nicht direkt durch Verminderung der ATP-Bildung evident wird, jedenfalls solange ein kritischer Grenzwert nicht unterschritten wird. Bei reiferen Erythrozyten treten sekundäre reaktionsferne Stoffwechselveränderungen auf, so erfolgt eine Erhöhung des DPG-Weges am Gesamtglukose-Umsatz. Es kommt zu einer Dissoziation von ATP-Synthese und Laktatbildung. Die Glykolyserate ist bei Pyruvatkinase-Mangel dort am wenigsten erhöht, wo die höchsten 2,3-DPG-Spiegel vorliegen (17). Anhand von einigen Beispielen seien Möglichkeiten aufgeführt, wie die Regulation des Erythrozytenstoffwechsels beeinflusst werden kann (26, 62, 14, 57). Travis (62) inkubierte menschliche Erythrozyten mit 50 mmolarer Glukose-Lösung und fand intraerythrozytär erhöhte Fruktose-Diphosphat- und Triose-Phosphat-Werte und erniedrigte 2,3-DPG-Konzentrationen. Der Quotient Laktat/Pyruvat war erhöht. Die Hemmung verschiedener Erythrozyten-Enzyme (14, 57) wurde bereits früher beschrieben. Von Srivastava (57) wurde der Effekt normaler Bestandteile auf die Aktivitäten der Erythrozyten-Enzyme geprüft. Pyridoxal-5-Phosphat hemmt die Hexokinase, Phosphoglukomutase, Phosphoglukose-Isomerase, Phosphofruktokinase, Aldolase, Pyruvatkinase und die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Auch Pyridoxol und Pyridoxin hemmen verschiedene glykolytische Enzyme, während Kreatin und Bikarbonat keinen Effekt zeigten. Die Behandlung von Erythrozyten mit Natrium-Fluorid zeigt eine Vielzahl von metabolischen Veränderungen, von denen die meisten auf Sekundäreffekten der Enolasehemmung beruhen, was ja die Pyruvat-Synthese reduziert und in die NAD-Bildung eingreift. ATP wird bei der Hexokinase- und Phosphofruktokinase-Reaktion verbraucht, aber nicht neu gebildet, da das Fehlen von NAD die Glyzerin-Aldehyd-Dehydrogenase limitiert. Dieser ATP-Entzug in Gegenwart von Fluorid und Kalzium führt zu einem massiven Verlust von Kationen und Wasser (26).

Die Bedeutung der Verformbarkeit des Erythrozyten

Für die Gewährleistung einer normalen Mikrozirkulation und auch für eine normale Lebensdauer des Erythrozyten ist es von größter Wichtigkeit, daß die Erythrozyten verformbar sind (40, 66, 67). Bei einem Hämatokrit über 60 % wird der Fluß durch die Mikrozirkulation abhängig von der Verformbarkeit des Erythrozyten. Die Lebensdauer des Erythrozyten hängt in vivo direkt mit dem Verlust der normalen Zellverformbarkeit zusammen. Diese Fähigkeit des normalen reifen Erythrozyten, sich zu verformen, hängt von mindestens drei Faktoren ab: einmal von der Aufrechterhaltung der bikonkaven Form, was ein hohes Verhältnis Oberfläche zu Volumen zur Folge hat, dann von einem normalen inneren Flüssigkeitszustand der Zelle, der in erster Linie von den Eigenschaften des normalen Hämoglobins abhängt und schließlich von der Verformbarkeit der Membran, die beeinflußt wird vom Verhältnis zwischen intrazellulärem ATP, Calcium und Magnesium und möglicherweise vom pH-Wert und dem Sauerstoff-Partialdruck in lokalen Gebieten der Mikrozirkulation (67). Die Wichtigkeit der Erythrozyten-Verformbarkeit wird erhellt durch die Tatsache, daß der mittlere Durchmesser eines Erythrozyten 7,5 μ beträgt, der Durchmesser der kleinsten Kapillaren aber weitaus kleiner ist. So hat Miller (40) einen möglichen Mechanismus für Kapillar-Verschluß aufgezeigt, indem er Erythrozyten mit Plasmodium Knowlesi infizierte und feststellte, daß die durch diese Behandlung starr gewordenen Erythrozyten sich in der Mikrozirkulation vieler Organe einschließlich der zerebralen Kapillaren von Rhesusaffen konzentrieren und zu einem Verschluß führen. Ähnlich veränderte Erythrozyten wurden bei mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, erblichem β -Lipoprotein-Mangel, Pyruvat-Kinase-Mangel und Alkoholzirkrose beobachtet (53, 64, 44, 55).

Veränderung im Enzymmuster der Blutzellen bei Diabetes mellitus

Im Vergleich zum normalen Glukose-Metabolismus im Erythrozyten zeigen sich bei Diabetes mellitus starke Veränderungen im Enzymmuster der intraerythrozytären Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Abbau-Weges. Nach Mitzkat und Wiegrefe (41) ist in den Erythrozyten von Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, der Fruktose-1,6-Diphosphat-Phosphatase, der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, der Fruktose-1,6-Diphosphat-Aldolase, der Glyzeroaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, der Phosphoglyzerat-Kinase, der Enolase, der Laktat-Dehydrogenase und der Malat-Dehydrogenase erhöht. In Ergänzung dazu finden sich in den Leukozyten dieser Patienten erhöhte Aktivitäten der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, der Fruktose-1,6-Diphosphat-Phosphatase, der Triose-Phosphat-Isomerase, der Phosphoglyzerat-Kinase, der Glyzeroaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und der Laktat-Dehydrogenase. In den Thrombozyten waren die Glyzerol-3-Phosphat-Dehydrogenase und die Malat-Dehydrogenase erniedrigt.

Mögliche rheologische Veränderungen der Blutzellen bei Diabetes mellitus

Wie beschrieben, hängt ein normales Fließverhalten der roten Blutzellen mit der normalen Fähigkeit der Erythrozyten zusammen, sich stark zu verformen. Da die Verformbarkeit der Erythrozyten zu einem großen Teil von einem normalen intraerythrozytären Stoffwechsel abhängig ist (66), und dieser bei Diabetikern verändert ist, wurden von verschiedenen Forschergruppen (15, 19, 48, 23) experimentelle Arbeiten über die Rheologie der Blutzellen in den kleinen Gefäßen (Kapillaren und kleinen Venolen) durchgeführt. Von einigen Autoren (19, 23, 48) wurde eine Aggregation von Blutzellen in den Mikrogefäßen und eine erhöhte Viskosität bei Diabetikern angegeben, aber

diese Ergebnisse stützten sich auf in-vitro-Untersuchungen des Blutes oder auf in-vivo-Analysen der Blutströmung in den Gefäßen der Konjunktiva. Branemark und Langer (15) untersuchten in Hautlappen von Diabetikern in vivo das Fließverhalten der Blutzellen und fanden, daß es nur dann zu einer Aggregation von Blutzellen kam, wenn unter einer Azidose eine schwere Stoffwechselstörung eingetreten war. Auch bei Langzeitdiabetes waren die Strömungseigenschaften der verschiedenen Blutzellarten normal. Heath und Brigden (29) berichteten ebenfalls, daß von ihnen bei keinem der untersuchten Diabetiker eine Erhöhung der Adhäsion von Thrombozyten gefunden werden konnte. Nachdem bekannt ist, daß die Thrombozyten unter dem Einfluß von ADP ihre Form verändern und sich leicht zu Aggregaten von bis zu 10 Einheiten verbinden, stellten Heath und Brigden fest, daß die Thrombozyten von Patienten mit Diabetes und aktiv fortschreitender Retinopathie einer geringen Gabe von ADP (0,2 mg/ml) gegenüber wesentlich empfindlicher sind als die von Patienten mit Diabetes ohne Retinopathie. Auch sind die Thrombozyten bei aktiv fortschreitender Retinopathie, die nach ADP-Zugabe Aggregate gebildet haben, in verringertem Maße fähig zu desaggregieren, wodurch, wenn dies in vivo vorkommen sollte, durchaus ein Verschluß von Kapillaren entstehen könnte.

Entstehung der diabetischen Angiopathie

Da, wie man gesehen hat, eine Beeinflussung der rheologischen Eigenschaften der Blutzellen durch Diabetes mellitus umstritten ist (15, 19, 23, 48, 29), konnten auch die manchmal beobachteten Veränderungen nicht einwandfrei in Zusammenhang mit den Spätfolgen des Diabetes, den Mikroangiopathien gebracht werden. Dagegen ist es wahrscheinlich, daß die beobachtete Hypersekretion des Wachstumshormons bei der Entwicklung der diabetischen Angiopathie eine Rolle spielt (35, 38). Dafür sprechen die Forschungsergebnisse von Lundbaek und Jensen (38), denen zufolge bei jugendlichen Diabetikern die Plasma-Spiegel des Wachstumshormons, vor allem nach körperlicher

Belastung, erhöht sind, eine Hypophysektomie einen hemmenden Effekt auf das Fortschreiten der diabetischen Retinopathie ausübt und die Brüchigkeit der Kapillaren in der Haut sich nach dieser Operation normalisiert. Auch von Kohner und anderen (35) konnte gezeigt werden, daß eine Entfernung der Hypophyse einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung der diabetischen Mikroangiopathie hat, so daß die Rate der nach der Hypophysenentfernung sich neu entwickelnden Schäden an den Mikrogefäßen gegenüber vorher stark abfällt.

Die Ursache der diabetischen Angiopathie ist unbekannt. Sie läßt sich in die subklinische funktionelle Mikroangiopathie und die klinische degenerative Mikroangiopathie einteilen (23). Die funktionelle Mikroangiopathie tritt sehr früh im Verlauf des Diabetes auf und äußert sich in dem Verlust des normalen Gefäßtonus und in der erhöhten Permeabilität (23, 24). Es gibt auch funktionelle Veränderungen der glomerulären Kapillaren bei jungen Diabetikern früh im Krankheitsverlauf, die durch angestiegene glomeruläre Filtrationsraten angezeigt werden (23). Daß diese frühzeitigen funktionellen Störungen an der Entwicklung des "long-term"-diabetischen Syndroms teilnehmen, ist ziemlich sicher. Die mögliche Entwicklung der irreversiblen degenerativen Retinopathie aus anfänglichen funktionellen reversiblen Veränderungen in den Arteriolen, Kapillaren und Venolen der Retina sieht Ditzel (23), wie folgt:

Während der ersten Jahre des Diabetes wird eine Exsudation in der Retina durch die relativ stark ausgeprägte Basalmembran der Retina-Gefäße verhindert. Wenn die Gefäße ihren Tonus wiedergewinnen, steigt die Flußrate in der kapillären-venösen Mikrozirkulation an und die Exsudation hört auf. Das Auftreten der Exsudation jedoch ist die Ursache dafür, daß die Basalmembran mit Plasma-Bestandteilen infiltriert wird, was die Endothel-Zellen anregt, saure Mukopolysaccharide zu produzieren, und zur gleichen Zeit belastet die Exsudation die funktionelle Kapazität der Basalmembran. Nach einigen Jahren wird die endotheliale Basalmembran langsam hyalinisiert und die Perizyten degenerieren. Die Erweiterung des venösen Teils der Mikrozirkulation ruft eine verlängerte Stase hervor, ein Zustand, von

dem bekannt ist, daß er kapilläre Mikroaneurysmen verursachen kann. Die Arteriolen-, Kapillar- und Venolenwände werden allmählich dicker und der Verschuß kann dauerhafter werden. Die Verschlüsse führen jetzt zu einer stagnierenden Anoxie des Retina-Gewebes. Neue Gefäßbildungen der Retina können vorkommen, und dieser Prozeß steht in direktem Zusammenhang mit einem Zustand der Anoxie im Gewebe der Retina.

Nach fünf bis zehn Jahre bestehendem Diabetes beginnen bei vielen Patienten die Symptome der Mikroangiopathie in zahlreichen Organen in Erscheinung zu treten; nach 15 bis 25 Jahren können sie in sehr vielen Fällen nachgewiesen werden.

Es ist verständlich, daß in diesem Rahmen nicht alle angeschnittenen Probleme eingehend erörtert werden konnten. Zweck dieses Kapitels sollte es sein, Themenkreise zu diskutieren, die in unmittelbarer oder indirekter Beziehung stehen mit dem Feld unserer Untersuchungen, um so die Interpretation unserer Ergebnisse zu erleichtern und die richtigen Zusammenhänge zu erkennen.

DISKUSSION DER EIGENEN ERGEBNISSE

Wohl die interessanteste Beobachtung, die bei den vorliegenden Untersuchungen gemacht wurde, war das Verhalten einer Gruppe von hyperglykämischen Diabetikern. Diese Patienten, die zur Normalisierung ihrer stark hyperglykämischen Stoffwechsellage (mittlere Blutzucker-Konzentration 312 mg/100 ml) ins Krankenhaus gekommen waren, hatten vor Beginn der Behandlung normale 2,3-DPG-Spiegel. Während nun ihre Blutzucker-Spiegel infolge der Therapie mit Insulin und oralen Antidiabetika sanken, nahmen auch ihre intraerythrozytären Konzentrationen an 2,3-DPG ab. Diese Abnahme der 2,3-DPG-Konzentration war signifikant und betrug etwa 20 % des Ausgangswertes. Einige Tage später stieg das 2,3-DPG wieder auf die normalen Ausgangswerte an und blieb konstant, obwohl die Blutglukose-Werte weiterhin niedrig, bei etwa 140 mg %, gehalten wurden.

Aus der Beobachtung dieses Effekts ergeben sich zwei Fragen.

- 1) Welche Konsequenzen für den Organismus zieht die Phase der erheblichen Konzentrationsverminderung an 2,3-DPG nach sich?
- 2) Warum tritt dieser Effekt überhaupt auf?

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, bewirkt eine Erniedrigung des 2,3-DPG-Spiegels in den Erythrozyten eine Linksverschiebung der Sauerstoff-Bindungskurve, woraus sich eine schlechtere Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff ergibt (9, 20). Im vorliegenden Fall wurde eine beträchtliche 2,3-DPG-Abnahme sichtbar bei drastischen Veränderungen der Blutglukose-Konzentration (von 312 auf 140 mg %). Analoge Effekte könnten bei schlecht eingestellten Diabetikern auftreten, deren Blutzucker-Spiegel erheblichen Schwankungen unterworfen sind. Diese Patienten wären also einer häufig wiederkehrenden und jeweils einige Tage anhaltenden peripheren Hypoxie ausgesetzt. Aus der Literatur (23) ist bekannt, daß bei der Entwicklung der diabetischen Mikroangiopathie im Stadium der funktionellen Mikroangiopathie auch eine Hypoxie des Kapillarendothels eine Rolle spielt.

Ob hier eine Verbindung besteht, sei dahingestellt; jedenfalls stellen sich bei Diabetikern, die - aus welchen Gründen auch immer - häufige hyperglykämische Entgleisungen ihres Diabetes erleiden, mikroangiopathische Spätschäden besonders frühzeitig ein.

Alle von uns untersuchten Patienten hatten normale Blut-pH-Werte. Dies ist für die 2,3-DPG-Untersuchungen besonders wichtig, da geringgradige pH-Verschiebungen beträchtliche 2,3-DPG-Konzentrationsänderungen verursachen. Alberti und Emerson (1) haben einen starken 2,3-DPG-Abfall bei der diabetischen Ketoazidose beschrieben, der mit der pH-Änderung korreliert. Die von uns beobachtete 2,3-DPG-Abnahme ist aber keineswegs mit einer pH-Änderung in Zusammenhang zu bringen. Im Gegenteil, hyperglykämisch entgleiste Diabetiker mit Azidose würden bei Behandlung eine Zunahme des pH-Wertes zeigen, was mit einer 2,3-DPG-Konzentrationserhöhung verbunden wäre.

Worauf kann der Effekt der 2,3-DPG-Abnahme basieren? Eine Stimulation der Glykolyse geht mit einem 2,3-DPG-Anstieg einher (1, 61, 6). Außerdem ist bekannt, daß die Glukose in den Erythrozyten ohne Insulin durch erleichterte Diffusion eindringen kann. Nimmt der Blutglukose-Spiegel nun ab, so könnte Glukose aus den Erythrozyten rückdiffundieren, wodurch die Glykolyserate durch Substrathemmung verringert wäre (47). Da unter dem Einfluß relativen Glukosemangels das Phosphat-Depot entleert wird, ergibt sich hieraus eine Abnahme der 2,3-DPG-Konzentration (58, 59, 62). Daß die 2,3-DPG-Werte einige Tage lang niedrig bleiben und dann wieder auf die normalen Ausgangswerte zurückkehren, wird durch die Trägheit des 2,3-DPG-Systems erklärt, das sich erst langsam auf die neuen Konzentrationsverhältnisse der Blutglukose einstellt. Auch von anderen Autoren (1, 6, 7) wurde diese Trägheit der 2,3-DPG-Anpassung beobachtet.

Zwei weitere Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die 2,3-DPG-Änderungen nicht durch die verschiedenen hohen Blutzucker-Spiegel, sondern durch die Größe der raschen Blutglukose-Veränderung verursacht werden.

- 1) Entgleiste Diabetiker mit sehr hohen Blutzucker-Spiegeln vor Beginn der Behandlung und Diabetiker mit einer Retinopathie, aber gut eingestellter Stoffwechsellage, hatten normale 2, 3-DPG-Werte.
- 2) Zwei Patienten mit plötzlichen hypoglykämischen Anfällen zeigten bei sehr niedrigen Blutzucker-Werten einen erheblichen 2, 3-DPG-Abfall.

2, 3-DPG kann sich demnach auf verschiedene Blutzucker-Spiegel einstellen, allerdings mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung.

In-vitro-Versuche, ausgeführt in zwei verschiedenen Systemen mit Blut von Diabetikern und Normalpersonen, das bei hohen oder niedrigen Glukose-Konzentrationen inkubiert wurde, bestätigten die Ergebnisse, die wir an Patienten in vivo gewonnen hatten. Blut hyperglykämischer Patienten, das gegen eine Glukose-Lösung von 80 mg/100 ml dialysiert oder darin gelöst wurde, zeigte ein beständiges Absinken der 2, 3-DPG-Konzentration über die siebenstündige Versuchsdauer. Dasselbe Blut, dialysiert gegen eine Glukose-Lösung von 400 mg/100 ml, zeigte diesen Effekt nicht.

Unseren Beobachtungen zufolge wäre es denkbar gewesen, daß ein rascher Anstieg der Blutglukose-Konzentration eine Zunahme des intraerythrozytären 2, 3-DPG-Spiegels verursachen hätte können; in vitro-Versuche mit Normalblut, dialysiert gegen eine Glukose-Lösung von 400 mg/100 ml, konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Als Erklärung bietet sich an, daß die Hexokinase, das erste Enzym der Glykolyse, unter normalen Bedingungen bereits voll ausgelastet ist; deshalb kann eine Erhöhung der intraerythrozytären Glukosekonzentration kaum eine Zunahme der Glykolyserate verursachen, so daß auch die 2, 3-DPG-Spiegel gleich bleiben.

In in-vitro-Versuchen wurde geprüft, ob der beobachtete Effekt der 2, 3-DPG-Abnahme bei Senkung der Blutglukose-Konzentration auf während der Behandlung hyperglykämisch entgleister Diabetiker ver-

wendetes Insulin oder Tolbutamid zurückzuführen ist. Durch Zugabe hoher Dosen von Insulin oder Tolbutamid zum in vitro-System veränderten sich die 2,3-DPG-Spiegel nicht. Damit übereinstimmend zeigte Cuatrecasas (21) vor kurzem, daß Erythrozytenmembranen keine Bindungsstellen für Insulin haben.

In Ergänzung zu den bisherigen Ausführungen war es nicht verwunderlich, daß die intraerythrozytären Konzentrationen an 2,3-DPG von Diabetikern und von Normalpersonen gut miteinander übereinstimmen. Vor kurzem veröffentlichten Rörth u. a. und Alberti u. a. (2, 51) ähnliche Ergebnisse.

Es bleibt festzuhalten, daß eine schnelle Senkung der Blutglukose-Konzentration bei der Behandlung hyperglykämisch entgleister Diabetiker oder spontan bei Diabetikern mit stark schwankender Stoffwechsellage eine Verminderung des 2,3-DPG-Spiegels in den Erythrozyten und damit eine temporäre Hypoxie des Gewebes mit sich bringt. Inwieweit dies in Zusammenhang zu bringen ist mit pathologisch veränderten Gefäßen in der Mikrozirkulation, den Spätfolgen des Diabetes mellitus, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

ZUSAMMENFASSUNG

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, den Einfluß der Blutglukose auf den 2,3-Diphosphoglyzerat-Spiegel (2,3-DPG) in den Erythrozyten zu prüfen. Dazu wurden zunächst Untersuchungen mit Blut von Gesunden, Diabetikern und zwei Patienten mit Inselzelltumoren durchgeführt. Die Konzentrationen der Blutglukose, des Hämoglobins, des ATP und des 2,3-DPG sowie der pH-Wert wurden gemessen. Es zeigte sich, daß die 2,3-DPG-Spiegel bei Gesunden und bei Diabetikern, die seit längerer Zeit hyperglykämisch, jedoch nicht-azidotisch waren, sowie bei Diabetikern, die seit mindestens einer Woche vor der Untersuchung befriedigend eingestellt waren, gut miteinander übereinstimmten und konstant blieben. Ein signifikantes Absinken des 2,3-DPG-Spiegels stellte sich bei hyperglykämischen, nichtazidotischen Patienten kurz nach der Normalisierung ihres Blutzuckerspiegels ein. Weiterhin ergab sich, daß eine schwere Hypoglykämie mit einer starken Erniedrigung der 2,3-DPG-Konzentration verbunden ist.

Die Ergebnisse wurden mit in-vitro-Modellen überprüft. Blut von Normalpersonen, gut eingestellten Diabetikern und hyperglykämischen Diabetikern wurde inkubiert und gegen Glukoselösung (80 bzw. 400 mg/100 ml) dialysiert. Die Ergebnisse der in-vivo-Versuche konnten in vitro bestätigt werden. Das gegen 80 mg/100 ml Glukoselösung dialysierte Blut der hyperglykämischen Diabetiker zeigte einen signifikanten Abfall der 2,3-DPG-Konzentration über die siebenstündige Versuchsdauer. In einem anderen Versuchsmodell wurde eine mögliche Beeinflussung des 2,3-DPG-Gehalts der Erythrozyten durch Insulin oder Tolbutamid ausgeschlossen. Dem Blut von Gesunden, gut eingestellten Diabetikern und hyperglykämischen Diabetikern wurde zu diesem Zweck entweder Insulin oder Tolbutamid zugegeben. Auch in diesem einfachen System bewirkte eine Senkung der Blutglukosekonzentration der Gruppe der hyperglykämischen Diabetiker - wie bei den Kontrollen - ein starkes Absinken des 2,3-DPG-Spiegels.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Alberti, K.G.M.M., Emerson, P.M., Darley, J.H. und Hockaday, T.D.R.
2,3-Diphosphoglycerate and tissue oxygenation in uncontrolled diabetes mellitus.
The Lancet, 391 - 395 (1972)
- (2) Alberti, K.G.M.M., Emerson, P.M., Darley, J.H. und Hockaday, T.D.R.
Red-cell 2,3-diphosphoglycerate and diabetes.
The Lancet I, 843 - 844 (1972)
- (3) Arnone, A.
Nature, 237: 146 (1972)
- (4) Ashton, N.
Retinal microaneurysm in the non-diabetic subject.
Brit. J. Ophthal. 35, 189 - 212 (1951)
- (5) Ashton, N. und Path, F.C.
Oxygen and the growth and development of retinal vessels.
Amer. J. Ophthal. 62, 412 - 432 (1966)
- (6) Astrup, P., Garby, L. und De Verdier, C.-H.
Displacements of the oxyhemoglobin dissociation curve.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 171 - 176 (1968)
- (7) Astrup, P., Rörth, M. und Thorshauge, C.
Dependency on acid-base status of oxyhemoglobin dissociation and 2,3-diphosphoglycerate level in human erythrocytes.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 26, 47 - 52 (1970)
- (8) Bellingham, A.J., Detter, I.C. und Lenfant, C.
Regulatory mechanism of hemoglobin oxygen affinity in acidosis and alkosis.
J. clin. Invest. 50, 700 - 706 (1971)

- (9) Benesch, R. und Benesch, R.E.
The effect of organic phosphates from the human erythrocyte
on the allosteric properties of hemoglobin.
Biochem. Biophys. Res. Com. 26, 162, 167 (1967)
- (10) Benesch, R.E., Maeda, N. und Benesch, R.
2,3-diphosphoglycerate and the relative affinity of adult and fetal
hemoglobin for oxygen and carbon monoxide.
Biochem. Biophys. Acta, 257, 178 - 182 (1972)
- (11) Benesch, R., Benesch, R.E. und Yu, C.I.
Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human
hemoglobin.
Biochemistry Vol. 59, 526 - 532 (1968)
- (12) Beutler, E., Meul, A. und Wood, L.A.
Depletion and regeneration of 2,3-diphosphoglyceric acid in
stored red blood cells.
Transfusion 9, 109 - 114 (1969)
- (13) Beutler, E.
General aspects of erythrocyte physiology and biochemistry.
Exp. Eye Res. 11, 261 (1971)
- (14) Beutler, E.
Inhibition of red cell enzymes by 2,3-diphosphoglycerate (2,3-
DPG).
J. of clin. Invest., Vol. 50, 7 a, 24 (1971)
- (15) Branemark, P.-I., Langer, L., Fagerberg, S.-E. und Breine, U.
Studies in rheology of human diabetes mellitus.
Diabetologia 7, 107, 112 (1971)
- (16) Brodal, B.P.
Evidence of an enzymatic degradation of insulin in blood in vitro.
Eur. J. Biochem. 18, 201 - 206 (1971)

- (17) Busch, D. und Boie, K.
Beiträge zum Problem des Pyruvatkinasemangels.
Folia Haematol. 91, 77 (1969)
- (18) Caldwell, P.R.B., Jaffé, E.R. und Nagel, R.L.
The content of 2,3-diphosphoglycerate in human erythrocytes:
effects of pH and oxygen.
Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes (Gerlach et al.).
Georg Thieme Verlag, 157 - 159 (1973)
- (19) Camerini-Davalos, R.A., Caulfield, J.B., Rees, S.B.,
Lozano-Castaneda, O., Naldjian, S., Marble, A.
Preliminary observations on subjects with prediabetes.
Diabetes 12, 508 - 518 (1963)
- (20) Chanutin, A. und Curnish, R.R.
Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen
equilibrium of human erythrocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 121, 96 - 102 (1967)
- (21) Cuatrecasas, P.
Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells.
Direct measurements and properties.
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1264 - 1268 (1971)
- (22) Deuticke, B., Duhm, J. und Dierkesmann, R.
Maximal elevation of 2,3-diphosphoglycerate concentrations in
human erythrocytes: influence on glycolytic metabolism and
intracellular pH.
Pflügers Arch. 326, 15 - 34 (1971)
- (23) Ditzel, J.
Functional microangiopathy in diabetes mellitus.
Diabetes 17, 388 - 397 (1968)

- (24) Ditzel, J.
Impaired oxygen release caused by alterations of the metabolism
in the erythrocytes in diabetes.
The Lancet 721 - 723 (1972)
- (25) Duhm, S.
2,3-Diphosphoglycerate metabolism of erythrocytes and oxygen
transport function of blood.
Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes (Gerlach et al.),
Georg Thieme Verlag, 149 - 157 (1973)
- (26) Feig, S.A., Segel, G.B., Shohet, S.B. und Nathan, D.G.
Energy metabolism in human erythrocytes.
The Journal of Clin. Invest. 51, 1547 (1972)
- (27) Garby, L.
Non-equivalent oxygen-linked binding of protons, carbon dioxide
and 2,3-diphosphoglycerate to human hemoglobin.
Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes (Gerlach et al.),
Georg Thieme Verlag, 160 (1973)
- (28) Hallmann, L.
Klinische Chemie und Mikroskopie, 10. Ed.
Verlag Georg Thieme, 591 (1966)
- (29) Heath, H., Brigden, W.D., Canever, J.V., Pollock, I.,
Hunter, P.R., Kelsey, J. und Bloom, A.
Platelet adhesiveness and aggregation in relation to diabetic
retinopathy.
Diabetologia 7, 308 - 315 (1971)
- (30) Herbert, V., Lau, K.S., Gottlieb, C.W. und Bleicher S.I.
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J. Clin. Endocrinol. 25, 1375 (1965)

- (31) Hohorst, H. -I.
Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Auflage (Bergmeyer, H.U.)
1425 - 1429, Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- (32) Slein, M. W.
Methoden der enzymatischen Analyse
1. Auflage (Bergmeyer, H.U.)
117 - 123, Verlag Chemie, Weinheim (1962)
- (33) Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. und Stark, H.
Methoden der enzymatischen Analyse
3. Auflage (Bergmeyer, H.U.)
1241 - 1246, Verlag Chemie, Weinheim (1974)
- (34) Karlson, P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 7. Auflage,
242 - 247, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1970)
- (35) Kohner, E.M., Dollery, C.T., Fraser, T.R. und Bulpitt, C.J.
Effect of pituitary ablation on diabetic retinopathy studied by
fluorescence angiography.
Diabetes, 19, 703 - 714 (1970)
- (36) Lamprecht, W. und Trautschold, I.
Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage,
(Bergmeyer, H.U.) 2024 - 2033 Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- (37) Lee, L.M.Y.
Purification and some properties of phosphofructokinase from
human erythrocytes.
Archives of Biochemistry and Biophysics 148, 607 - 613 (1972)
- (38) Lundbaek, K., Jensen, V.A., Olsen, T.S., Orskov, H.,
Christensen, N.J., Johansen, K., Hansen, A.P. und Osterby, R.
Diabetes, diabetic angiopathy and growth hormone.
The Lancet, 131 - 133 (1970)

- (39) Mentzer, W.C., Baehner, R.L., Schmidt-Schönbein, H., Robinson, S.H. und Nathan, D.G.
Selective reticulocyte destruction in erythrocyte pyruvate kinase deficiency.
Journ. of Clin. Invest., 50, 688 - 699 (1971)
- (40) Miller, L.H., Usami, S. und Chien, S.
Alteration in the rheologic properties of plasmodium knowlesi-infected red cells. A possible mechanism for capillary obstruction.
Journ. of Clin. Invest., 50, 1451 - 1455 (1971)
- (41) Mitzkat, H.I., Wiegrefe, K. und Meyer, U.
Enzyme patterns of the energy-linked metabolism in blood cells of human diabetics.
Horm. Metab. Res. 4, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 107 - 110, (1972)
- (42) Mulhausen, R., Astrup, P. und Kjedsen, K.
Oxygen affinity of hemoglobin in patients with cardiovascular diseases, anemia and cirrhosis of the liver.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 19, 291 - 297 (1967)
- (43) Nygaard, S.F. und Rörth, M.
An enzymatic assay of 2,3-diphosphoglycerate in blood.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 24, 399 - 403 (1969)
- (44) Oski, F.A., Nathan, D.G., Sidel, V.W. und Diamond, L.K.
Extreme hemolysis and red-cell distortion in erythrocyte pyruvate kinase deficiency. I. Morphology, erythrokinetics and family enzyme studies.
N. Engl. J. Med. 270: 1023 (1964)
- (45) Paniker, N.V. und Beutler, E.
Pyruvate effect in maintenance of ATP and 2,3-DPG of stored blood.
J. Lab. clin. Med. 78, 472 - 482 (1971)

- (46) Perutz, M.F.
Nature 228: 726 (1970)
- (47) Rapoport, S.
Stoffwechselregulation der roten Blutzelle.
Folia Haematol. 91, 298 (1965)
- (48) Rees, S.B., Camerini-Davalos, R.A., Caulfield, J.B.,
Lozano-Castaneda, O., Cervantes-Amezcus, A., Taton, J.,
Pometta, D., Krauthammer, J.P., Marble, A.
Pathophysiology of microangiopathy in diabetes mellitus.
CIBA Found. Coll. Endocrin. 15, 315 - 344 (1964)
- (49) Rörth, M.
Dependency on acid-base status of blood of oxyhemoglobin dissociation and 2,3-diphosphoglycerate level in human erythrocytes. I. In vitro-studies on reduced and oxygenated blood.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 26, 43 - 46 (1970)
- (50) Rörth, M.
Effects of some organic phosphate compounds on the oxyhemoglobin dissociation curve in human erythrolysate.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 22, 208 - 210 (1968)
- (51) Rörth, M., Parving, H.-H. und Munkgaard, S.
Red-cell oxygen affinity and 2,3-diphosphoglycerate in diabetes.
The Lancet I, 1179 (1972)
- (52) Rose, J.A.
Regulation of human red cell glycolysis: a review.
Exp. Eye Res. 11, 264 - 272 (1971)
- (53) Rubenberg, M.L., Regoecki, E., Bull, B.S., Dacie, J.V. and Brain, M.C.
Microangiopathic haemolysis and red cell fragmentation by defibrination in vivo.
Brit. J. Haematol. 14, 627 (1968)

- (54) Schweigart, U., Böning, D., Tibes, U. und Hemmer, B.
The influence of physical activity on the 2,3-diphosphoglycerate concentration of erythrocytes and the oxygen dissociation curve in men.
Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes (Gerlach et al.),
Georg Thieme Verlag, 168 - 170 (1973)
- (55) Smith, J.A., Lonergan, E.T. und Sterling, K.
Spur-cell anemia. Hemolytic anemia with red cells resembling acanthocytes in alcoholic cirrhosis.
N. Engl. J. Med. 271, 396 (1964)
- (56) Snyder, C.M. und Reddy, W.J.
Mechanism of action of thyroid hormones on erythrocyte 2,3-diphosphoglyceric acid synthesis.
J. of Clin. Invest. 49, 1993 (1970)
- (57) Srivastava, S.K. und Beutler, E.
The effect of normal red cell constituents on the activities of red cell enzymes.
Archives of Biochemistry and Biophysics 148, 249 - 255 (1972)
- (58) Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. und Fredrickson, D.S.
The metabolic basis of inherited disease.
McGraw-Hill Book Company, 2. Auflage
Kap. 47, 1063 - 1066 (1966)
- (59) Stanbury, J.B., Wyngaarden, J. B. und Fredrickson, D.S.
The metabolic basis of inherited disease.
McGraw-Hill Book Company, 2. Auflage
Kap. 45, 1038 - 1044 (1966)
- (60) Standl, E., Kolb, H., Standl, A. und Mehnert, H.
The effect of diabetes on erythrocytes 2,3-diphosphoglycerate.
Diabetologia 9, 91 (1973)

- (61) Torrance, J., Jacobs, P., Restrepo, A., Eschbach, J., Lenfant, C. und Finch, C.A.
Intraerythrocytic adaption to anemia.
N. Engl. J. of Med. 283, 165 - 169 (1970)
- (62) Travis, S.F., Morrison, A.D., Clements, R.S., Winegrad, A.J. und Oski, F.A.
Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration.
J. of Clin. Invest., 50, 2104 - 2112 (1971)
- (63) Valentine, W.N.
Introduction to discussion of regulation of erythrocyte glycolysis.
Exp. Eye Res. 11, 273 - 279 (1971)
- (64) Van Buchem, F.S.P., Pol, G., De Gier, J., Botticher, C.J.F. und Pries, C.
Congenital β -lipoprotein deficiency.
Amer. J. Med. 40: 794 (1966)
- (65) Versmold, H., Kohne, E., Riegel, K.P., Betke, K. und Kleihauer, E.
Oxygen carrying function of blood in hereditary methemoglobinemia: ambivalent effects of 2,3-diphosphoglycerate.
Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes (Gerlach et al.),
Georg Thieme Verlag, 171 - 174 (1973)
- (66) Weed, R.I., La Celle, P.L. und Merrill, E.W.
Metabolic dependence of red cell deformability.
J. of Clin. Invest. 48, 795 - 809 (1969)
- (67) Weed, R.I.
The importance of erythrocyte deformability.
Amer. J. of Med. 49, 147 - 150 (1970)

- (68) Woodson, R.D., Torrance, J.D., Shappell, S.D. und Lenfant, C.
The effect of cardiac disease on hemoglobin-oxygen binding.
J. of Clin. Invest. 49, 1349 - 1356 (1970)

Herrn Prof. Dr. H. Mehnert, Chefarzt der III. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing und Leiter der Forschergruppe Diabetes, danke ich für die Überlassung des Themas und seine großzügige Förderung meiner Arbeit.

Für seine stets verständnisvolle Unterstützung und bereitwillige und wertvolle Hilfe bei chemischen und technischen Problemen möchte ich Herrn Dr. H. Kolb meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gebührt meinem Bruder Dr. E. Standl für sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Jederzeit stand er mir mit Rat und Tat zur Seite; es war mir eine große Freude, durch meinen älteren Bruder in die Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt zu werden.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 6. Mai 1949 in München als zweiter Sohn des praktischen Arztes Dr. Rudolf Standl und seiner Ehefrau Angelika Standl, geborene Gessner, geboren. Von September 1955 bis Juli 1959 besuchte ich die Volksschule in München, von September 1959 bis Juli 1965 das Albert-Einstein-Gymnasium in München und vom September 1965 bis Juli 1968 das Theresiengymnasium in München, wo ich im Juni 1968 die Reifeprüfung ablegte. Von Oktober 1968 bis Juli 1974 studierte ich Medizin an der Universität München, legte im Herbst 1969 das Vorphysikum im Frühjahr 1971 das Physikum und im Frühjahr/Sommer 1974 das Staatsexamen ab. Mit der Doktorarbeit begann ich im Januar 1972 und hoffe, im Herbst 1974 das Promotionsexamen ablegen zu können. Am 2. September 1974 habe ich im Krankenhaus München-Schwabing meine erste Stelle als Medizinalassistent angetreten.

